

**KORRELATION ZWISCHEN
EKTOPISCHER PRODUKTION VON
SCHWANGERSCHAFTSSPEZIFISCHEM
BETA-I-GLYKOPROTEIN (SPI) UND
HUMAN PLACENTAL LACTOGEN (HPL) SOWIE
DER PROGNOSE BEI BRUSTKREBS**

Michael Groh

1979



Digitized by the Internet Archive
in 2026

AUS DER II.FRAUENKLINIK
DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN
(DIREKTOR: PROF.DR.K.RICHTER)

und

AUS DEM PATHOLOGISCHEN INSTITUT
DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN
(DIREKTOR: PROF.DR.M.EDER)

KORRELATION ZWISCHEN EKTOPISCHER PRODUKTION VON
SCHWANGERSCHAFTSSPEZIFISCHEM BETA-1-GLYKOPROTEIN
(SP1) UND HUMAN PLACENTAL LACTOGEN (HPL) SOWIE
DER PROGNOSE BEI BRUSTKREBS

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
MICHAEL GROH
aus Karlsruhe
München 1979

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der
Universität München

1.Berichterstatter:	Prof.Dr.K.Richter
2.Berichterstatter:	Prof.Dr.K.Prechtel
Mitberichterstatter:	Prof.Dr.M.Eder
Dekan:	Prof.Dr.W.Spann



Tag der mündlichen Prüfung: 18.Mai 1979

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1.0. <u>Einführung</u>	1
1.1. Ektopische Produktion von Hormonen und Proteinen	1
1.2. human placental lactogen (hPL)	2
1.3. schwangerschaftsspezifisches β 1-Glykoprotein (SP1)	4
1.4. Rolle der Schwangerschaftsproteine in der Gravidität	7
1.5. human placental lactogen (hPL) und β 1-Glykoprotein (SP1) als Tumor-Marker	10
1.6. Aufgabenstellung in der vorliegenden Arbeit	11
2.0.0. <u>Patienten, Materialien und Methodik</u>	13
2.1.0. Patienten	13
2.1.1. Art der Operation	13
2.1.2. Strahlentherapie	13
2.1.3. Zweitoperation	13
2.1.4. Stadieneinteilung	14
2.1.5. Überlebenszeit	14
2.2.0. Materialien	14
2.2.1. Gewebeproben	14
2.2.2. Seren	15
2.2.3. Pufferlösungen	15
2.2.4. Diaminobenzidin (DAB)	15
2.2.5. Blockierung der Erythrozyten-Pseudoperoxidase	15
2.2.6. Kernfärbung	16
2.3.0. Methodik	16
2.3.1. Vorbemerkung: Die Immunperoxidase-Enzymbrücken-Methode	16
2.3.2. Ausführung	18

	Seite
2.3.3. Kontrollen	21
3.0.0. <u>Ergebnisse</u>	23
3.1.1. Immunperoxidase-Enzymbrücken-Methode	23
3.1.2. Übereinstimmung der Anfärbungsbeurteilung	23
3.1.3. Mehrfachfärbungen	30
3.1.4. Einteilung der Färbeintensität	30
3.2. Vergleichbarkeit des Patientenguts	31
3.3.0. Prognostische Bedeutung der Tumoranfärbbarkeit für hPL und β 1-Glykoprotein	31
3.3.1. Ergebnisse der Nachforschungen zum Verlauf	31
3.3.2. Anfärbbarkeit der Karzinome	32
3.3.3. Histologische Klassifizierung und Anfärbbarkeit	32
3.3.4. Histologischer Karzinomtyp und Überlebensrate	34
3.3.5. Anfärbbarkeit für hPL und SP1 und Überlebensrate	34
3.3.6. Überlebenszeit der Patientinnen	35
3.3.7. Sonstige Ergebnisse	37
4.0. <u>Diskussion</u>	38
4.1. Immunperoxidase-Enzymbrücken-Methode	38
4.2. Unterschiedliche Anfärbbarkeit von hPL- und SP1-Schnitten	39
4.3. Kontrollen und Mehrfachbestimmungen	39
4.4.0. Prognostische Bedeutung der Tumoranfärbbarkeit	40
4.4.1. Literaturvergleich	40
4.4.2. Histologischer Karzinomtyp, Anfärbbarkeit und Überlebensrate	41

	Seite
4.4.3. Überlebenszeit	42
4.4.4. Zur Berechnung einer statistischen Signifikanz	43
5.0. <u>Zusammenfassung</u>	44
6.0. <u>Addendum</u>	45
Danksagung	45
7.0. <u>Literaturverzeichnis</u>	46

Abbildung 7, Tabellen 1 - 13 im Anhang

1.0. Einführung

1.1. Ektopische Produktion von Hormonen und Proteinen

Man weiß seit längerer Zeit, daß bösartige Tumoren, auch solche, die in normalerweise nicht endokrin aktivem Gewebe entstehen, Hormone sowie hormonähnliche Proteine synthetisieren können.

1962 beschrieben LIDDLE et al (LIDDLE G.W., ISLAND D. und MEADOR C.K., 1962) ein Syndrom mit ektopischer Produktion von Corticotropin (ACTH) durch einen malignen Tumor nicht-hypophysären Ursprungs. Zwei Jahre später isolierten Arbeitsgruppen in den Vereinigten Staaten (BOWER B.F., MASON D.M. und FORSHAM P.H., 1964) und England (LEE J., JONES J.J. und BARRACLOUGH M.A., 1964) aus Plasma und Urin von Patienten mit Bronchialkarzinom ein Protein, das ähnliche Wirkung wie das antidiuretische Hormon (ADH) hatte. In den folgenden 10 Jahren erkannte man, daß bösartige Tumoren jedes bisher bekannte Polypeptidhormon sezernieren konnten, unter anderen Corticotropin-releasing-Faktoren (AMATRUDA T.T., UPTON Jr. und UPTON G.V., 1974) und human growth hormone (hGH)-releasing-Faktoren (BECK C., LARKINS R.G., MARTIN T.J. und BURGER H.G., 1973).

Auch ektopische Produktion von Gonadotropinen ist seit langem bekannt: sie wurden unter anderen in Bronchialkarzinomen (FUSCO F.D. und ROSEN S.W., 1966; FAIMAN C., COLWELL J.A., RYAN R.J. et al, 1967; BECKER K.L., COTTRELL J.C., MOORE C.F. et al, 1968; ROSEN S.W., BECKER C.E., SCHLAFF S., EASTON J. und GLUCK M.C., 1968; MOCHIZUKI M., TOKURA Y., TOKURA T. et al, 1969; DAILEY J.E. und MARCUSE P.M., 1969), in Hepatomen oder Hepatoblastomen (REEVES R.L., TESLUK H. und HARRISON C.E., 1959; MACNAB G.H., MONCRIEFF S.A. und BUDIAN M., 1952; BEHRLE F.C., MANTZ F.A., OLSON R.L. et al, 1963; LIPSETT M.B., ODELL W.D., ROSENBERG L.E. et al, 1964; HUNG W., BLIZZARD R.M., MIGEON C.J. et al, 1963; ROOT A.W., BOGIO-

VANNI A.M. und EBERLEIN W.R., 1968) sowie in Nebennieren-Karzinomen (McFADZEAN A.J.S., 1946; CHAMBERS W.L., 1949; HIGGINS G.A., BROWNLEE W.E. und MANTZ F.A.Jr., 1956; ROSE L.I., WILLIAMS G.H., JAGGER P.I. et al, 1968) gefunden. So beschrieben ROSEN und Mitarbeiter (ROSEN S.W., BECKER C.E., SCHLAFF S., EASTON J. und GLUCK M.C., 1968) die erhöhte Gonadotropin-Konzentration im Plasma eines Patienten mit Gynäkomastie, ein Jahr vor der klinischen Entdeckung von dessen Bronchialkarzinom. 1973 gelang BRAUNSTEIN und VAITUKAITIS (BRAUNSTEIN G.D., VAITUKAITIS J.L., CARBONE P.P. und ROSS G.T., 1973) die bis dahin nicht getroffene Unterscheidung zwischen hypophysären Gonadotropinen und Choriongonadotropin ektoptischen Ursprungs. Weitere schwangerschaftsspezifische Hormone wie das human placental lactogen (hPL) (GASPARD U., HENDRICK J.C., REUTER A.M. und FRANCHIMONT P., 1973; SUSSMAN H.H., ROSEN S.W. und WEINTRAUB B.D., 1971; SUSSMAN H.H., WEINTRAUB B.D. und ROSEN S.W., 1974; WEINTRAUB B.D. und ROSEN S.W., 1969; WEINTRAUB B.D. und ROSEN S.W., 1971; SHEETH N.A., SURAIYA J.N., SHEETH A.R., RANADIVE K.J. und YUSSAWALLA D.J., 1977) sowie das schwangerschaftsspezifische β 1-Glykoprotein (SP1) (HORNE C.H.W., REID I.N. und MILNE G.D., 1976; TATARINOV Yu.S. und SOKOLOV A.V., 1977) konnten ebenfalls in den verschiedensten nicht-trophoblastischen und nicht-gonadalen Tumoren gefunden werden.

1.2. human placental lactogen (hPL)

1962 entdeckten JOSIMOVICH und MAC LAREN (JOSIMOVICH J.B. und MAC LAREN J.A., 1962) im menschlichen Retroplazentarblut eine neue Substanz, die immunologisch Beziehung zum menschlichen Hypophysen-Wachstumshormon (hGH) und ähnliche Eigenschaften hatte wie das Wachstumshormon und das luteotrope Hormon (LTH, Prolaktin). Sie nannten die neue Substanz human placental lactogen (hPL), andere schlugen den Namen chorionic growth

hormone-prolactin (GRUMBACH M.M., KAPLAN S.L., SCIARRA J.J. und BURR I.M., 1968) oder human chorionic somatomammotropin (LI C.H., GRUMBACH M.M., KAPLAN S.L., JO-SIMOVICH J.B. et al, 1968) vor. Es entstand viel Verwirrung, denn außer den oben erwähnten Namen wurden auch Begriffe wie placental protein (FRIESEN H.G., 1965) und purified placental protein (human) (PPP(H)) (FLORINI J.R., TONELLI G., BREUER C.P., CAPOLLA J., RINGLER J. et al, 1966) benutzt. Deswegen wurde auf der letzten Konferenz (1972) über laktogene Hormone empfohlen (YLIKORKALA O., 1973), den Namen human placental lactogen solange zu benutzen, bis die noch weitgehend unklare physiologische Rolle dieses Proteins erkannt ist.

HPL ist ein vom Zytoplasma des Zottenepithels (Zyotrophoblast und Synzytiotrophoblast) gebildetes (BOHN H. und SEDLACEK H., 1975) Polypeptidhormon mit einem Molekulargewicht von 21 600, bestehend aus 191 Aminosäuren, von denen 160 (83.7%) in identischer Position wie beim Wachstumshormon (hGH) sind (LI C.H., DIXON J.S. und CHUNG D., 1971; SHERWOOD L.M., HANDWERGER S., McLAURIN W.D. und LANNER M., 1971; LI C.H., DIXON J.S. und CHUNG D., 1973). Zwei sich innerhalb der Kette befindende Disulfidbrücken sind notwendig für seine immunologische Aktivität, nicht jedoch für seine laktogene Wirkung (ALOJ S.M., EDELHOCH H., HANDWERGER S. und SHERWOOD L.M., 1972; HANDWERGER S., PANG E. C., ALOJ S.M. und SHERWOOD L.M., 1972). Seine Konzentration im mütterlichen Serum erreicht Werte von 0.3-0.8 mg/100 ml (BOHN H., 1971), die Halbwertszeit ist kurz, sie beträgt zwischen 10.8 und 20.2 Minuten (GRUMBACH M.M., KAPLAN S.L., SCIARRA J.J. und BURR I.M., 1968; PAVLOU C., CHARD T. und LETCHWORTH A.T., 1972; SINGER W., DESJARDINS P. und FRIESEN H.G., 1970). Aus einer ausgewachsenen menschlichen Plazenta von bis 600 g kann man etwa 100 mg hPL extrahieren (BOHN H. und SEDLACEK H., 1975). HPL wird schnell metabolisiert, das metabolisierende Organ ist aber nicht bekannt.

Der mütterliche Urin enthält hPL nur in Spuren, trotzdem war bei nephrektomierten Hunden die hPL-Schwundrate herabgesetzt (ROCHMAN H., VARNAVIDES L.A. und HAWLEY P.R., 1972); die Niere könnte also bei der Eliminierung von hPL eine Rolle spielen.

Während der Schwangerschaft zeigt hPL neben den laktogenen und wachstumsfördernden Eigenschaften auch eine Wirkung auf den Lipid- und Kohlehydratstoffwechsel: man nimmt an, daß hPL unter anderem die mütterlichen Lipide als Energiequelle mobilisiert und die Kohlehydrate für den Foeten reserviert (BOHN H., 1975).

Auch eine immunsuppressive Wirkung von hPL ist beschrieben: CONTRACTOR und DAVIES (CONTRACTOR S.F. und DAVIES H., 1973) konnten zeigen, daß die mit Phytohämagglutinin (PHA) induzierte Lymphozyten-Transformation durch vorherige Inkubation mit hPL - zumindest in vitro (JOHANNSEN R., HAUPT H., BOHN H., HEIDE K., SEILER F.R. und SCHWICK H.G., 1976) - stark supprimiert werden konnte.

Da das human placental lactogen und das Affen-Plazenta-Laktogen immunologisch sehr nahe verwandt sind - im Geldiffusionstest geht die mit Anti-hPL gegen Schimpansenenserum erhaltene Präzipitatlinie ohne Sporn in die von human placental lactogen gebildete Linie über (BOHN H. und SEDLACEK H., 1975) - sind Untersuchungen von hPL mit Affen in vivo möglich.

1.3. Schwangerschaftsspezifisches β 1-Glykoprotein (SP1)

Seit Anfang der sechziger Jahre beschäftigten sich verschiedene Forschergruppen mit den Proteinen der menschlichen Plazenta (BUNDSCHUH G., 1966; BUNDSCHUH G., RITTMER C., BAYER H. und GESERICK G., 1967; BERG K. und BEARN A.G., 1966; SMITHIES O.U., 1959; ALFONSO J.F. und ALVAREZ R.R.de, 1963; ALFONSO J.F. und FARNHAM N.G., 1962; COOPER D.W., 1963). Die von KUCZYNSKI (KUCZYNSKI J.W., 1969) und TATARINOV (TATARINOV Yu.S. und MASYUKEVICH V.N., 1970) nachgewiesenen, bei der Elektrophorese im Beta1-Bereich

wandernden Schwangerschaftsproteine sind wahrscheinlich mit dem schwangerschaftsspezifischen β 1-Glykoprotein (SP1) identisch (BOHN H.,1971). Die Eigenschaften des schwangerschaftsspezifischen β 1-Glykoproteins wurden erstmals 1971 ausführlich von BOHN (BOHN H.,1971) beschrieben, 1972 konnte BOHN das Protein aus dem Extrakt menschlicher Plazenten rein darstellen (BOHN H.,1972).

Das schwangerschaftsspezifische β 1-Glykoprotein (SP1) ist ein vom Zytoplasma des Zottenepithels (Zytotrophoblast und Synzytiotrophoblast) gebildetes (BOHN H. und SEDLACEK H.,1975; BOHN H.,1975), kohlehydratreiches Glykoprotein mit Affinität zu Steroidhormonen (BOHN H. und KRANZ T.,1973), mit einem Molekulargewicht von $90\,000 \pm 5\,000$ (BOHN H.,SCHMIDTBERGER R. und ZILG H., 1976; BOHN H.,1974) und mit einer Halbwertszeit im mütterlichen Blut von 34 Stunden (TATRA G.,TEMPFER H. und PLACHETA P.,1976) bzw. von 30-40 Stunden (BOHN H.,1975). SP1 ist ab der 8.Schwangerschaftswoche mit Hilfe der Immunelektrophorese im mütterlichen Blut nachzuweisen, seine Konzentration steigt ab der 20.Schwangerschaftswoche kontinuierlich an und erreicht um die 37.Schwangerschaftswoche ein Plateau. Die Serumkonzentrationen liegen dabei zwischen 10 und 30 mg/100 ml (BOHN H.,1972; EIERMANN W. und LINK A.,1977; TATRA G.,TEMPFER H. und PLACHETA P.,1976). Das schwangerschaftsspezifische β 1-Glykoprotein übertrifft damit in seiner Konzentration die aller anderen bisher bekannten Schwangerschaftsproteine im mütterlichen Blut (BOHN H.,1972), wird andererseits aber in der Nabelschnur, im Serum des Neugeborenen sowie im Fruchtwasser nur in Spuren gefunden (BOHN H., 1971; TATRA G.,POLAK S. und PLACHETA P.,1976). Die SP1-Konzentration im Fruchtwasser beträgt etwa ein Hundertstel der SP1-Konzentration im mütterlichen Serum (TATRA G.,POLAK S. und PLACHETA P.,1976). Im Urin schwangerer Frauen erscheint β 1-Glykoprotein in immunchemisch veränderter Form, denn es hat einen Teil seiner Antigendeterminanten verloren und gibt im Geldiffusionstest mit dem

Serumprotein einen Sporn; offenbar wird SP1 im Organismus abgebaut und als Spaltstück ausgeschieden (BOHN H., 1971; BOHN H., 1972).

Von einer ausgewachsenen menschlichen Plazenta, die bis 600 g wiegt, kann man etwa 30 mg β 1-Glykoprotein extrahieren (BOHN H., SCHMIDTBERGER R. und ZILG H., 1976). Nach der Entbindung verschwindet SP1 in 1-2 Wochen aus dem mütterlichen Serum (BOHN H., 1975).

Im Gegensatz zur früheren Ansicht (BOHN H., 1972; BOHN H., 1974) besteht β 1-Glykoprotein nur aus einer Peptidkette (BOHN H., SCHMIDTBERGER R. und ZILG H., 1976). Sein Kohlehydratanteil beträgt 29.3% (Hexosen 11.7%, Hexosamine 10.2%, Fucose 0.6% und Neuraminsäure 6.8%) (BOHN H., SCHMIDTBERGER R. und ZILG H., 1976).

SP1 enthält auf 1 Mol Eiweiß etwa ein halbes Mol Eisen. Unklar ist dabei, ob es eine besondere Affinität zum Eisen besitzt oder ob eine Bindung dieses Metalls mit der Funktion von β 1-Glykoprotein in engerem Zusammenhang steht (BOHN H., SCHMIDTBERGER R. und ZILG H., 1976).

Die physiologische Bedeutung von β 1-Glykoprotein ist bis heute noch weitgehend unbekannt. Hormonale Eigenschaften besitzt das Protein nicht (BOHN H., SCHMIDTBERGER R. und ZILG H., 1976).

Verwandtschaft oder Kreuzreaktion mit menschlichen Hormonen oder Proteinen anderer Art konnte bisher nicht nachgewiesen werden (BOHN H., 1975). TATRA und Mitarbeiter (TATRA G., TEMPFER H. und PLACHETA P., 1976) fanden jedoch Hinweise dafür, daß zwischen der SP1-Konzentration und dem Kohlehydratmetabolismus der Mutter Wechselbeziehungen bestehen: sowohl nach Insulin-induzierter Hypoglykämie wie auch Hyperglykämie, hervorgerufen durch Infusion von 50%-iger Glukose, waren die Serumspiegel von β 1-Glykoprotein 24 Stunden nach Beginn des Versuchs signifikant höher als 1 Stunde bzw. 15, 60 oder 120 Minuten nach Beginn des Versuchs. Sie lagen

aber auch höher als zu Beginn des Versuchs.

Auch β 1-Glykoprotein hat in vitro unter Bedingungen im physiologischen Bereich (100 μ g SP1/ml Kultur) (BOHN H., SCHMIDTBERGER R. und ZILG H., 1976) eine ähnliche Hemmwirkung auf die Lymphozytentransformation, wie das CONTRACTOR und DAVIES (CONTRACTOR S.F. und DAVIES H., 1973) für hPL und hCG zeigen konnten. Da aber die Einwirkung von isolierten Proteinen auf die gemischte Lymphozytenkultur als ein komplexes Geschehen betrachtet werden muß (JOHANNSEN R., HAUPT H., BOHN H., HEIDE K., SEILER F.R. und SCHWICK H.G., 1976), kann aufgrund der In-vitro-Befunde allein nicht unbedingt auf eine immunsuppressive Wirkung in vivo geschlossen werden (BOHN H., SCHMIDTBERGER R. und ZILG H., 1976).

Das menschliche β 1-Glykoprotein und das Rhesusaffen- β 1-Glykoprotein sind in der Aminosäurezusammensetzung als auch in der Kohlehydratzusammensetzung sehr ähnlich (BOHN H., SCHMIDTBERGER R. und ZILG H., 1976). Im Gelddiffusionstest zeigt die Präzipitatlinie, erhalten mit Anti-Human- β 1-Glykoprotein gegen Affenserum, eine Spornbildung (BOHN H., SEDLACEK H., 1975) gegenüber menschlichem Schwangerenserum. Da also Serum trächtiger Affenweibchen mit Anti-Human-SP1 Kreuzreaktion zeigt und somit immunologisch verwandt ist, ist es möglich, mit Affen unter In-vivo-Bedingungen die physiologische Aufgabe von β 1-Glykoprotein zu untersuchen.

1.4. Rolle der Schwangerschaftsproteine in der Gravidität

Über die immunologischen Beziehungen der Mutter zu Foet und Plazenta besteht heute noch weitgehend Unklarheit. Foet und Plazenta unterscheiden sich genetisch und damit auch in ihren antigenen Eigenschaften von der Mutter. Sie sind Fremdgewebe, die eigentlich von der Mutter abgestoßen werden müßten. Trotzdem werden Foet und Plazenta für die Dauer der Schwangerschaft von der Mutter toleriert.

Die Vermutung, der Uterus stelle einen immunologisch

privilegierten Ort dar, konnte dadurch widerlegt werden, daß im Tierversuch normales, aber fremdes Gewebe (Haut), in die Uteruswand eingepflanzt, zu einer Graft-Versus-Host-Reaktion und damit zur Abstoßung führte (SCHLESINGER M., 1962; BILLINGHAM R.E. und BEER E.A., 1971). Die Annahme, die immunologische Reaktionsfähigkeit der Mutter sei geschwächt, ist zumindest umstritten und zweifelhaft, die Untersuchungen am Tiermodell sind widersprüchlich: Hauttransplantate überleben in trächtigen Kaninchen länger als in nichtschwangeren Tieren, bei Maus und Rind konnte Entsprechendes nicht festgestellt werden (BILLINGHAM R.E., 1964). Die Hypothese, eine anatomische Barriere trenne Mutter und Foet, besitzt gewisse Wahrscheinlichkeit: KIRBY und Mitarbeiter (KIRBY D.R.S., BILLINGTON W.D., BRADBURY S. und GOLDSTEIN D.J., 1964) wiesen bei Mäusen in der Plazenta eine Fibrinoidschicht aus sauren Mukopolysacchariden nach, die den Zutritt mütterlicher Lymphozyten zu den foetalen Antigenen verhindern soll. Sollte eine solche Barriere beim Menschen bestehen, so ist sie sicher nicht immer voll wirksam, denn es konnte eindeutig nachgewiesen werden, daß in der Schwangerschaft sowohl foetale Blutzellen (CREGER W.P. und STEELE M.R., 1957; DESAI R.G. und CREGER W.P., 1963) als auch Synzytiotrophoblastzellen (DOUGLAS G.W., THOMAS L., CARR M., CULLEN N.M. und MORRIS R., 1959) in den mütterlichen Blutkreislauf übertreten. Daher könnte also eine anatomische Barriere allein die mütterliche Immunantwort nicht unterdrücken. Eine weitere Theorie, wonach sogenannte "blockierende Faktoren" im Serum der Mutter eine schützende Funktion ausüben, könnte ebenfalls zutreffen: man nimmt an, daß Antigene oder lösliche Antigen-Antikörper-Komplexe sich an die Rezeptoren der T-Lymphozyten anlagern und diese blockieren oder auch, daß es sich um Antikörper handeln könnte, die sich an die Zielzelle anlagern und so die dort befindlichen Antigene maskieren (BOHN H., 1975). Hinweise auf eine mögliche Richtigkeit der beiden letztgenannten Hypothesen finden sich in der Tumorummunolo-

gie: man glaubt, daß sich Tumorzellen mit Glykoproteinen und Mukopolysacchariden überziehen, wodurch die Tumorantigene abgeschirmt werden (APFFEL C.A. und PETERS J.H., 1969). Andererseits hat man im Serum tumortragender Tiere "blockierende Faktoren" nachgewiesen (HELLSTRÖM K.E., HELLSTRÖM I. und BRAUN J., 1969), die in der Lage waren, gegen den Tumor aktivierte Lymphozyten in ihrer Wirkung zu unterdrücken.

1971 gelang es EL TOMI und Mitarbeitern (EL TOMI A.E.F., BOOTS L. und STEVENS V.C., 1971) erstmals, mit Antikörpern gegen ein definiertes Protein der menschlichen Plazenta, gegen hPL, die Fertilität bei Tieren zu beeinflussen. Durch Verabreichung von Anti-hPL-Kaninchenserum konnte bei Ratten die Gravidität unterbrochen werden. Ähnliche Befunde teilte auch GUSDON (GUSDON J.P., 1972) mit. Vermutlich beruht die abortive Wirkung von Anti-hPL auf immunologischer Verwandtschaft von menschlichem- und Ratten-Plazenta-Laktogen (BOHN H., 1975).

1974 konnten BOHN und WEINMANN (BOHN H. und WEINMANN E., 1974) zeigen, daß Applikation von Kaninchenantikörpern gegen das schwangerschaftsspezifische β 1-Glykoprotein (human) beim trächtigen Affenweibchen (*Cynomolgus*) zum Abort führte (8 von 10 Tieren). Die Tiere bekamen 4-8 Wochen nach Verabreichung von Anti-SP1 wieder normale Regelblutungen und wurden nach der ersten Deckung erneut trächtig (BOHN H. und WEINMANN E., 1974).

Wie oben erwähnt, konnte sowohl ektopisch gebildetes hPL als auch ektopisch gebildetes β 1-Glykoprotein in den verschiedensten Karzinomen nicht-trophoblastischen und nicht-gonadalen Ursprungs gefunden werden. Es trifft also zu, daß ein bösartiger Tumor, wahrscheinlich im Rahmen der Entdifferenzierung durch Derepression von Genen, befähigt ist, Proteine zu synthetisieren, die im Normalgewebe nicht synthetisiert werden können, aus dem der Tumor stammt. Haben diese Proteine aber immunsuppressive Wirkung, wie das in vitro für hCG, hPL und SP1

gezeigt werden konnte (CONTRACTOR S.F. und DAVIES H., 1973; BOHN H., SCHMIDTBERGER R. und ZILG H., 1976), so wäre es dem Tumor möglich, durch Blockierung der Abwehr sich der immunologischen Erkennung zu entziehen und unbeeinträchtigt zu wachsen (HORNE C.H.W., REID I.N. und MILNE G.D., 1976).

1.5. Human placental lactogen (hPL) und β 1-Glykoprotein (SP1) als Tumor-Marker

Das Auftreten ektopisch gebildeter Hormone bzw. Proteine führte bald zu der Überlegung, sie als Hinweis auf ein malignes Geschehen zu betrachten, wenn sie im Serum von Patienten mit Hilfe von Radioimmunoassays (RIA) nachgewiesen werden können. Solche Tumor-Marker müssen spezifisch sein, d.h. sie dürfen nicht im Serum gesunder Männer und gesunder, nicht-schwangerer Frauen erscheinen. Diese Bedingung ist nicht für alpha-fetoprotein (ROUSLAHTI E. und SEPPÄLÄ M., 1972) und nur mit gewisser Einschränkung ("falsch"-positiv bei Alkohol-leber, Dialysepatienten und nach Nierentransplantation) (MOORE T.L., KUPCHIK H.Z., MARCON N. und ZAMCHEK N., 1971) für das carcinoembryonic antigen (CEA) gegeben, trifft aber für hCG, hPL und β 1-Glykoprotein bisher unwider-sprochen zu (SAMAAN N.A., SMITH J.P., RUTLEDGE F.N. und SCHULTZ P.N., 1976; ROSEN S.W., WEINTRAUB B.D., VAITUKA-ITIS J.L., SUSSMAN H.H., HERSHMAN J.M. und MIGGIA F.M., 1975; WEINTRAUB B.D. und ROSEN S.W., 1973).

WEINTRAUB und ROSEN (WEINTRAUB B.D. und ROSEN S.W., 1971) wiesen mit Radioimmunoassay in 11 von 128 Fällen hPL im Serum von Patienten nach, die alle histologisch verifizierte Karzinome nicht-trophoblastischen und nicht-gonadalen Ursprungs hatten. SAMAAN und Mitarbei-ter (SAMAAN N.A., SMITH J.P., RUTLEDGE F.N. und SCHULTZ P.N., 1976) untersuchten mit RIA das Serum von 65 Pati-enten mit Ovarialkarzinom: sie fanden in 47 Fällen ho-
he hPL-Plasmaspiegel, in 29 Fällen hohe β -hCG-Plasma-

spiegel und in 34 Fällen hohe CEA-Plasmaspiegel. Mit hPL-messendem Radioimmunoassay fanden SHEETH und Mitarbeiter (SHEETH N.A., SURAIYA J.N., SHEETH A.R., RANADIVE K.J. und JUSSAWALLA D.J., 1977) bei Mammakarzinom in 10 von 72 Fällen positive hPL-Spiegel, mit hCG-RIA in 12 von 72 Fällen positive hCG-Spiegel. TATARINOV (TATARINOV Yu.S., FALALEEVA D.M. und KALASHNIKOV V.V., 1976) fand bei Patienten mit Chorionepitheliom β 1-Glykoprotein im Immundiffusionstest in 15 von 35 Fällen positiv, mit Autoradiographie dagegen in 26 von 35 Fällen positiv; die dazu benutzten Gewebeproben waren zuvor in Paraffin eingebettet worden.

1.6. Aufgabenstellung in der vorliegenden Arbeit

Wenn man die bisher angestellten Überlegungen miteinander verknüpft, so kann man

1. vielleicht in fixierten, in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitten von Karzinomen schwangerschaftsspezifische Proteine nachweisen.
2. versuchen, eine Korrelation zwischen ektopischer Produktion von schwangerschaftsspezifischen Proteinen und der klinischen Bösartigkeit (schnelles, ungehemmtes Wachstum) herauszufinden.
3. daraus vielleicht Schlüsse auf Art und Radikalität der Therapie sowie der Prognose für den Patienten ziehen.

HORNE und Mitarbeiter (HORNE C.H.W., REID I.N. und MILNE G.D., 1976) erhielten in 50 Fällen von histologisch nachgewiesenem Mammakarzinom an Formalin-fixierten, in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitten mit einer spezifischen Immunperoxidase-Enzymbrücken-Methode in 76% SP1-positive, in 82% hPL-positive und in 60% hCG-positive Resultate: Tumoren, die für SP1 stark positiv (++) waren, hatten gegenüber SP1-negativen (-) die schlechteste Prognose (maximal 2 Jahre Überlebenszeit der Patienten postoperativ). Nach 8 Jahren waren die Überlebensraten in diesen beiden Gruppen signifikant unter-

schiedlich. In ähnlicher Weise zeigt ein Vergleich von SP1-negativen Tumoren mit den Bewertungsgruppen "positiv" (+) und "fraglich positiv" (+/-) signifikanten Unterschied in den Überlebensraten.

Patienten mit hPL-negativen Karzinomen zeigten einen ähnlichen Anstieg der Überlebensrate verglichen mit den Gruppen, deren Karzinom für hPL stark positiv (++), positiv (+) oder fraglich positiv (+/-) war.

Keine signifikanten Unterschiede ergaben sich zwischen der Patientengruppe mit hCG-negativen Karzinomen und den Patientengruppen mit Anfärbbarkeit der Karzinome nach einer der 3 Bewertungsstufen (+/-), (+) und (++).

In der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden:

1. Ist die von HORNE und Mitarbeitern benutzte Methode zum Nachweis von hPL und β 1-Glykoprotein in Karzinomen der menschlichen Brustdrüse reproduzierbar.
2. Sind die Ergebnisse - positive Anfärbbarkeit der Gewebeschnitte mit den Bewertungsgruppen (-), (+/-), (+) und (++) - in Korrelation zu bringen mit der Überlebenszeit der Patienten und mit dem Wachstumsverhalten des Tumors.

2.0.0. Patienten, Materialien und Methodik

2.1.0. Patienten

Alle in die Untersuchung einbezogenen 64 Patientinnen waren an Mammakarzinom erkrankt und wurden mit Ausnahme von 4 Patientinnen (1 mal 1956, 3 mal 1971) 1972 in verschiedenen Krankenhäusern Bayerns operiert. Die jüngste Patientin war 29 Jahre, die älteste 65 Jahre alt.

2.1.1. Art der Operation

Art und Radikalität der Operation variierten. In einem Fall wurde eine Gewebeprobe bei metastasierendem Mammakarzinom entnommen (Ablatio 1956), in 3 Fällen eine Gewebeprobe bei Lokalrezidiv (Ablationes 1971). In 4 von 64 Fällen wurde eine einfache Mastektomie durchgeführt, in 56 Fällen eine Mamma-Amputation mit Ausräumung der Axilla.

2.1.2. Strahlentherapie

Auch die Strahlentherapie variierte. 48 von 64 Patientinnen wurden bestrahlt, 7 Patientinnen erhielten aufgrund ihres klinisch schon weit fortgeschrittenen Karzinoms Vorbestrahlung und 6 Wochen nach der Operation die Nachbestrahlung. 3 Patientinnen erhielten zur Nachbestrahlung eine Kastrationsbestrahlung, 6 Patientinnen erhielten Palliativbestrahlung, 32 Patientinnen erhielten eine einfache Nachbestrahlung. 3 Patientinnen bekamen keine Bestrahlung, von 13 Patientinnen waren Informationen über eine Strahlenbehandlung nicht zu erhalten.

2.1.3. Zweitoperation

In 38 von 64 Fällen konnten Informationen über eine mögliche Zweitoperation eingeholt werden. Eine Patientin hatte 4 Monate nach der Brustabnahme eine zweite Operation aus unbekannter Ursache, bei 2 Patientinnen wurde 5 bzw. 14 Monate nach der ersten Mamma-Amputation auch die andere Brust abgenommen, 6 Patientinnen hatten eine Rezidivoperation. 29 Patientinnen hatten keine

Zweitoperation, von 26 Patientinnen waren zu dieser Fragestellung keine Angaben zu erhalten.

2.1.4. Stadieneinteilung

Nicht alle Fälle waren in den zuständigen Kliniken ausdrücklich nach einer der gebräuchlichen Stadieneinteilungen für Mammakarzinome (HAAGENSEN C.D., 1971) klassifiziert worden. In diesen Fällen wurde die Einteilung retrospektiv nach den in den Krankenblättern vermerkten klinischen Zeichen vorgenommen. Für die Klassifizierung des Mammakarzinoms wurde das international gebräuchliche TNM-System (Schema zur Klassifizierung des Mammakarzinoms, 1976) benutzt. War die Stadieneinteilung nach einem anderen gebräuchlichen System vorgenommen worden, so wurde sie nach diesem Schema in das TNM-System übertragen. Erst, wenn die TNM-Stadieneinteilung nach klinischen Gesichtspunkten erfolgt war, wurde die endgültige pathologisch-anatomische Diagnose eingesehen und damit die klinische Einteilung ergänzt. Von 4 Patientinnen konnte das Tumorstadium nicht in Erfahrung gebracht werden.

2.1.5. Überlebenszeit

Die Überlebenszeit der Patientinnen wurde vom Tag der Operation an gerechnet.

2.2.0. Materialien

2.2.1. Gewebeproben

Von 64 Patientinnen mit nachgewiesenem Mammakarzinom waren 92 Gewebeproben routinemäßig in 10% Formalin fixiert, anschließend in Paraffin eingebettet und mindestens 5 Jahre lang gelagert worden. Es wurden 5 μ m dicke Schnitte angefertigt und auf mit Glyzerin-Eiweiß vorbehandelte (ROMEIS B., 1968) Glasträger aufgezogen. Die Objektträger wurden anschließend für ca. 20 Minuten in einen Brutschrank (50 Grad Celsius) gebracht, damit die Gewebsschnitte fester haften (ROMEIS B., 1968).

2.2.2.Seren

Anti- β 1-Glykoprotein (Anti human β 1SP1-Glycoprotein) vom Kaninchen sowie Anti-human-placental-lactogen (Anti-hPL) vom Kaninchen wurden von BEHRING-WERKE AG, Marburg a.d.Lahn, Peroxidase-Antiperoxidase (PAP) vom Kaninchen und Anti-Kaninchen-Serum-IgG vom Schwein wurden von MEDAC, Hamburg (c/o DAKOPATTS, Dänemark) bezogen.

Anti-SP1 wurde 1:60 verdünnt, Anti-hPL 1:20, unspezifisches Kaninchenserum 1:20, unspezifisches Schweineserum und Schweine-Anti-Kaninchen-IgG 1:20 sowie Peroxidase-Antiperoxidase-Komplex 1:50 (HORNE C.H.W., 1977). Serumverdünnungen wurden vor jedem Experiment frisch angesetzt.

2.2.3.Pufferlösungen

Zur Verdünnung der Immunseren und der unspezifischen Seren wurde Tris-HCl-Puffer (0.05 M Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (MERCK Darmstadt, MERCK 8386) pH 7.6), zur Spülung der bearbeiteten Objektträger Tris-Saline (Tris-HCl-Puffer 100 ml, 0.85% NaCl (MERCK 6404) 900 ml) verwendet (HORNE C.H.W., 1977).

2.2.4.Diaminobenzidin (DAB)

Zur Erkennung der Immunperoxidase-Enzymbrücke wurde 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB) (SIGMA Chemicals Company, St.Louis) 30 mg in 50 ml Tris-HCl-Puffer benutzt (HORNE C.H.W., 1977; MASON T.E., PHIFER R.F., SPICER S.S., SWALLOW R.A. und DRESKIN R.B., 1969). Die DAB-Tris-HCl-Pufferlösung wurde zu jedem Versuch unmittelbar vor Inkubation der Objektträger frisch zubereitet. Zu je 50 ml Lösung wurde 1 Tropfen H_2O_2 30% (Perhydrol 30%; MERCK 8597) zugefügt (HORNE C.H.W., 1977; MASON T.E., PHIFER R.F., SPICER S.S., SWALLOW R.A. und DRESKIN R.B., 1969).

2.2.5.Blockierung der Erythrozyten-Pseudoperoxidase

Zur Blockierung der Erythrozyten-Pseudoperoxidase in-

kubierte STREEFKERK (STREEFKERK J.G., 1972) Formalinfixierte Gewebeschnitte zuerst in absolutem Methanol, dann in phosphatgepufferter Saline, die 0.0125% H_2O_2 enthielt. WEIR et al (WEIR E.E., PRETLOW T.G. und PITTS A., 1974) blockierten die endogene Peroxidase mit 0.074% HCl und Äthanol statt Methanol. HORNE (HORNE C.H.W., 1977) kombinierte diese beiden Methoden und verwendete eine Methanol-HCl- H_2O_2 -Lösung, die 0.074% HCl und 1% H_2O_2 enthielt. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Methanol-HCl- H_2O_2 -Lösung (0.08% HCl, 0.74% H_2O_2) benutzt. Mit dieser Methode war die Erythrozyten-Pseudoperoxidase ausreichend blockiert.

2.2.6. Kernfärbung

Die Kernfärbung wurde mit saurer Hämalaunlösung nach MAYER (ROMEIS B., 1968) durchgeführt, die fertigen Schnitte mit ENTELLAN^R (MERCK 7960) eingedeckt.

2.3.0. Methodik

2.3.1. Vorbemerkung: Die Immunperoxidase-Enzymbrücken-Methode

Mit der Einführung der Immunfluoreszenz-Methode im Jahr 1941 durch COONS und Mitarbeiter (COONS A.H., CREECH H.J. und JONES R.N., 1941; COONS A.H., 1956) war es möglich geworden, die Anwesenheit von Immunglobulinen, in Zellen oder an Gewebskomponenten gebunden, nachzuweisen. Der Gebrauch von Immunfluoreszenzmethoden erfordert jedoch unfixiertes, gefrorenes Gewebe (TAYLOR C.R. und BURNS J., 1974) oder nach SAINTE-MARIE in kaltem Alkohol fixierte Gewebe (SAINTE-MARIE G., 1962). Da die spezifische Fluoreszenz rasch schwächer wird, ist es schwierig, direkt auf frühere Arbeiten zurückzugreifen und es besteht so das Problem der Vergleichbarkeit und damit der Standardisierung. Auch können Immunfluoreszenzmethoden für routinemäßig in Formalin fixierte Gewebe nicht benutzt werden, da durch die Formalinfixierung eine Verstärkung der Gewebsautofluoreszenz erfolgt, die jede spezifische Flu-

oreszenz verdeckt (TAYLOR C.R. und BURNS J., 1974). Durch Einführung von Antikörpern, die mit Meerrettichperoxidase markiert waren (NARKANE P.K. und PIERCE G.B., 1966; NARKANE P.K., 1968; AVRAMEAS S. und TERNYNCK T., 1969), wurde es möglich, die Gewebeschnitte länger zu benutzen, wenn sie erst einmal gefärbt waren. Von verschiedenen Autoren wurden Immunfluoreszenz- und Meerrettichperoxidase-Methode ausführlich miteinander verglichen (NARKANE P.K. und PIERCE G.B.Jr., 1966; DAVEY F.R. und BUSCH G.J., 1970; PETTS V. und ROITT I.M., 1971), Spezifität und Sensibilität der neuen Methode erfolgreich erprobt. Allerdings hat auch diese Methode den möglichen Nachteil, daß durch die notwendige chemische Konjugation der Meerrettichperoxidase an den spezifischen Antikörper, der ja nur gegen ein Gewebsantigen und nicht auch gegen Meerrettichperoxidase gerichtet ist, entweder die Immunspezifität des Antikörpers oder die Aktivität des Marker-Enzyms beeinflusst wird (MASON T.E., PHIFER R.F., SPICER S.S., SWALLOW R.A. und DRESKIN R.B., 1969).

MASON und Mitarbeiter (MASON T.E., PHIFER R.F., SPICER S.S., SWALLOW R.A. und DRESKIN R.B., 1969) berichteten über ein neues Verfahren, das die Nachteile der beiden oben erwähnten Methoden vermeiden kann und damit vielleicht noch sensibler ist: das Marker-Enzym ist nicht mehr chemisch mit dem spezifischen Antikörper verbunden, sondern wird mit Hilfe einer Antigen-Antikörper-Reaktion an das eine Ende einer Immunglobulin-Brücke gekoppelt, deren anderes Ende ebenfalls durch Antigen-Antikörper-Reaktion mit dem gesuchten Gewebsantigen verbunden ist. Diese in der englischsprachigen Literatur sehr anschaulich auch als Sandwich beschriebene Immunperoxidase-Enzymbrücke besteht im Prinzip aus den folgenden Bestandteilen:

1. spezifischer Antikörper gegen ein Gewebsantigen (z.B. Kaninchen-Antikörper gegen hPL oder humanes β 1-Glykoprotein)

2. Antikörper gegen das Immunglobulin der Spezies, in der Komponente 1 hergestellt wurde (z.B. Schweine-Anti-Kaninchen IgG)
3. Antikörper gegen ein Marker-Enzym, hergestellt in derselben Spezies wie Komponente 1 (z.B. Kaninchen-Antikörper gegen Meerrettichperoxidase)
4. Marker-Enzym (z.B. Meerrettichperoxidase), das mit Hilfe von Diaminobenzidin (DAB) sichtbar gemacht werden kann.

Siehe hierzu Abbildung 1.

Zur Kontrolle versuchten MASON und Mitarbeiter in gesunden Geweben Gewebsantigene nachzuweisen, die aufgrund ihrer physiologischen Funktion und Lokalisation dieses Antigen nicht enthalten konnten. Der Versuch mißlang, ebenso, wenn man statt einem der spezifischen Antiseren normales Serum derselben Spezies hinzufügte. Auch behandelten sie Schnitte mit der Immunfluoreszenz-Technik, verglichen beide Ergebnisse und konnten damit Spezifität und Sensibilität der neuen Methode sichern.

Ein Vorteil dieser Methode ist, daß der gegen das Marker-Enzym gerichtete Antikörper (Komponente 3) nicht spezifisch sein muß, um von Komponente 2 gebunden zu werden. Ein weiterer Vorteil ist, daß das Marker-Enzym nicht chemisch mit dem Antikörper konjugiert werden muß, sondern dies durch Antigen-Antikörper-Reaktion erfolgt.

2.3.2. Ausführung

Bei der Färbung der Gewebeproben von 64 Karzinomfällen (92 Gewebeproben) wurden Kontrollen, auf hPL zu untersuchende und auf β 1-Glykoprotein zu untersuchende Schnitte in einem Arbeitsgang bearbeitet.

Die Schnitte wurden zur Inkubation mit den verschiedenen Seren (2-3 Tropfen pro Objektträger) in feuchte Kammern eingebracht. Zur Vermeidung von methodischen Fehlern wurde Schritt 8 (siehe unten) für jede der drei Fraktionen mit frischer Tris-Saline durchgeführt.

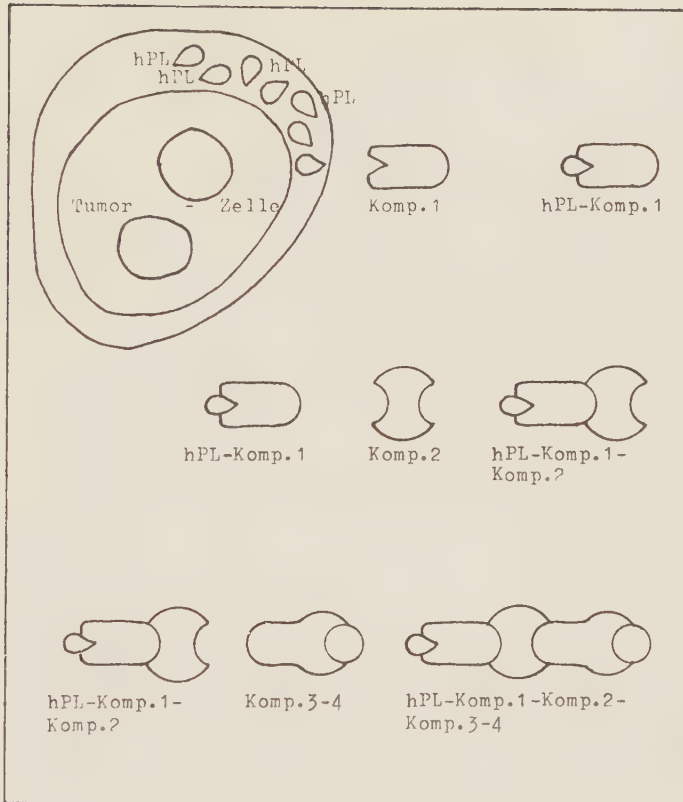


Abb.1: Prinzip der Immunperoxidase-Enzymbrücken-Methode

hPL=Gewebsantigen; Komp.1=Anti-hPL-IgG (Kaninchen); Komp.2=Anti-Kaninchen-IgG (Schwein); Komp.3-4=Peroxidase-Antiperoxidase-Komplex (Kaninchen)

1. Zum Entparaffinieren in Xylol I und Xylol II je 10 Min.
2. In absoluten Alkohol (99.5%) I und II je 5 Min.
3. Erythrozytenpseudoperoxidase-Blockierung mit Methanol-HCl-H₂O₂ 30 Min.

4. Vorsichtiges Wässern unter fließendem Wasser 5 Min.
5. Spülen mit Tris-Saline, um optimalen pH für die Immunreaktionen zu erhalten 5 Min.
6. Überschichtung mit unspezifischem Schweineserum 1:20 zur Abdeckung des Gewebehintergrundes (TAYLOR C.R., 1974; HEYDERMAN E. und NEVILLE A.M., 1977) 120 Min.
7. Dekantieren und mit verdünntem Antikörper gegen ein Gewebsantigen (1:20 für hPL und unspezifisches Kaninchen-serum, 1:60 für β 1-Glykoprotein) überschichten 30 Min.
8. In 3 aufeinanderfolgenden Tris-Saline-Bädern spülen 5 Min.
9. Mit Anti-Kaninchen-Serum vom Schwein 1:20 überschichten 30 Min.
10. In 3 aufeinanderfolgenden Tris-Saline-Bädern spülen 5 Min.
11. Mit Peroxidase-Antiperoxidase-Komplex (PAP) 1:50 überschichten 30 Min.
12. In 3 aufeinanderfolgenden Tris-Saline-Bädern spülen 5 Min.
13. Färben in DAB-Tris-HCl-Puffer 30 mg DAB in 50 ml Puffer, pro 50 ml 1 Tropfen frische H_2O_2 30% 4 Min.
14. In 3 aufeinanderfolgenden Tris-Saline-Bädern spülen 5 Min.
15. Spülen in Aqua destillata 5 Min.
16. Inkubieren in Hämalaun 2 1/2 Min.
17. Vorsichtig unter fließendem Wasser spülen 15 Min.
18. Kurz in Eosin eintauchen 20 Sek.
19. Spülen in Aqua destillata 1 Min.
20. Entwässern in Äthanol 70% 2 Min.
21. Entwässern in Äthanol 96% 2 Min.
22. Entwässern in absolutem Äthanol (99.5%) 2 Min.

- | | |
|--|---------|
| 23. Entwässern in Carbol-Xylol | 2 Min. |
| 24. Klären in Xylol I und II mindestens je | 10 Min. |
| 25. Eindecken mit Entellan ^R | |

Schritt 18 wurde nach der Hälfte der Versuche verlassen, da sich herausstellte, daß die Intensität der spezifischen Färbung schneller und leichter zu beurteilen war, wenn Eosin nicht mitfärbte. Auf eine Nachbehandlung der noch nicht eingedeckten Schnitte mit OsO_4 zur Vermeidung von Färbeschwund (MASON T.E., PHIFER R.F., SPICER S.S., SWALLOW R.A. und DRESKIN R.B., 1969) wurde verzichtet, da sie sich in Vorversuchen als unzweckmäßig für die Beurteilung der Färbeintensität herausstellte. Man konnte damit von vorne herein nur positive und negative Anfärbungsergebnisse unterscheiden, nicht aber schwach positive (+) oder fraglich positive (+/-). Die Schnitte wurden nach Eindeckung und Beurteilung im Dunkeln aufbewahrt, sodaß auch nach bisher etwa einem Jahr noch kein Färbeschwund bemerkt werden konnte.

2.3.3. Kontrollen

Zur Kontrolle der Anfärbungsspezifität wurde in Vorversuchen einmal der spezifische Antikörper gegen das Gewebsantigen weggelassen (Schritt 7) und statt dessen mit Tris-HCl-Puffer inkubiert oder es wurde in den Schritten 7, 9 oder 11 das spezifische Antiserum durch unspezifisches Serum derselben Spezies ersetzt. Zusätzlich wurde bei jeder Färbung für jedes der Karzinome spezifisches Anti-hPL bzw. Anti- β 1-Glykoprotein (Schritt 7) durch unspezifisches Kaninchenserum zur Dauerkontrolle ersetzt, sodaß für jedes untersuchte Gewebsstück eine Kontrolle, eine Anti-hPL-Färbung und eine Anti-SP1-Färbung existiert. In 26 Fällen wurde Mammarkarzinomgewebe, das an verschiedenen Stellen des Körpers einer Patientin entnommen worden war, gefärbt und nach Unterschieden in der Anfärbbarkeit gesucht. Auch wurde Plazentagewebe, das physiologischerweise hPL und β 1-Glyko-

protein enthält, gefärbt (siehe dazu Abbildung 2 und Ergebnisse).

Einige positive sowie fraglich positive Gewebsschnitte wurden zu DR.HORNE (Aberdeen,Schottland) geschickt, um Spezifität und Beurteilung der Anfärbung überprüfen zu lassen.

Die Schnitte wurden von 3 Untersuchern beurteilt und die Ergebnisse der Beurteilung verglichen.

3.0.0. Ergebnisse

3.1.1. Immunperoxidase-Enzymbrücken-Methode

In der Literatur wird als physiologischer Bildungsort der schwangerschaftsspezifischen Proteine hPL (YLIKOR-KALA O., 1973; BOHN H. und SEDLACEK H., 1975) und β 1-Glykoprotein (BOHN H. und SEDLACEK H., 1975; BOHN H., 1975; TATARINOV Yu.S., FALALEEVA D.M., KALASHNIKOV V.V. und TOLOKNOV B.O., 1976) das Zytoplasma des Zottenepithels (Zytotrophoblast und Synzytiotrophoblast) angegeben. Zur Überprüfung der Immunperoxidase-Enzymbrücken-Methode wurde daher Plazentagewebe in der oben geschilderten Versuchsanordnung gefärbt. Abbildung 2 zeigt, daß das Zottenepithel der Chorionzotten in der Kontrollfärbung nicht gefärbt wurde, in der hPL-Färbung und in der SP1-Färbung dagegen ein dichter goldbrauner Saum das Zottenstroma umgibt. Goldbraun ist die typische Färbung der sich im Zytoplasma des Zottenepithels befindenden Schwangerschaftsprotein-Antikörper-Komplexe.

In den Abbildungen 2.2. und 2.3. ist erkennbar, daß auf dem hPL-Schnitt das Zottenepithel intensiver gefärbt ist als auf dem SP1-Schnitt. Diese Beobachtung wurde bei allen untersuchten positiven SP1-Schnitten gemacht. In Vorversuchen wurde daher die Verdünnung des Anti-SP1-Serums in Tris-HCl-Puffer, pH 7.6 (gewöhnlich 1:60 (HORNE C.H.W., 1977)) variiert (1:40, 1:50 und 1:70), ohne daß sich dabei wesentliche Veränderungen in der Anfärbbarkeit der Schnitte zeigten. So wurde die von HORNE angegebene Verdünnung von 1:60 in den folgenden Versuchen beibehalten und die SP1-Schnitte wurden später entsprechend beurteilt.

Es wurden Gewebeproben von 64 Mammakarzinom-Fällen (92 Gewebeproben) untersucht. Abbildung 3 zeigt Ergebnisse der Anfärbung von Mammakarzinomen.

3.1.2. Übereinstimmung der Anfärbungsbeurteilung

Bei 9 von 92 Karzinomschnitten unterschied sich die Be-

Abb.2.0. : Plazentagewebe

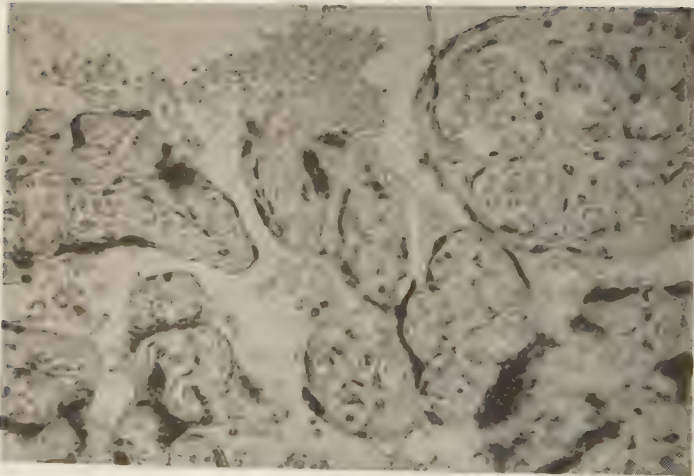


Abb.2.1. : Kontrolle mit unspezifischem Kaninchen-
serum

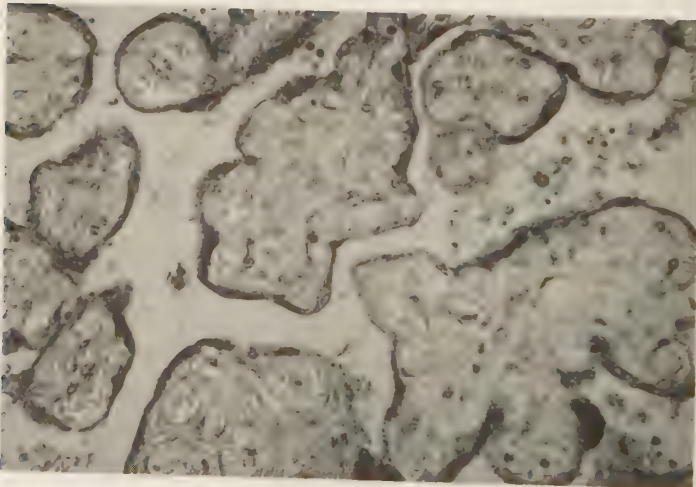


Abb.2.2. : Spezifische hPL-Färbung; das Zottenepithel
stellt sich als goldbrauner Saum dar

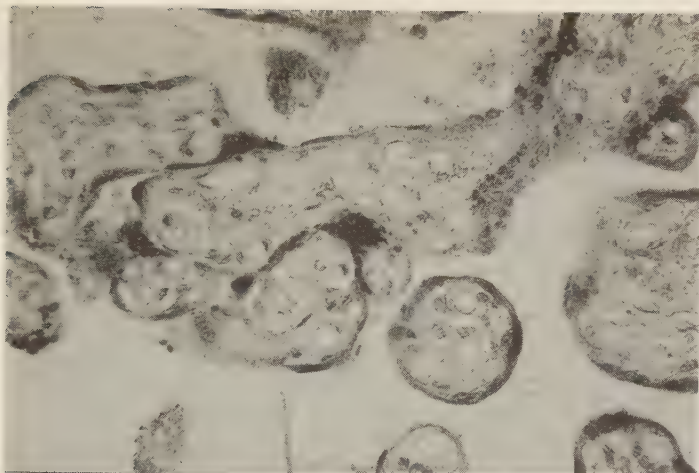


Abb.2.3. : Spezifische SP1-Anfärbung; Zottenepithel als brauner Saum. Anfärbungsintensität geringer als in Abb.2.2.

Abb.3.0.0. : Mammakarzinom-Gewebe

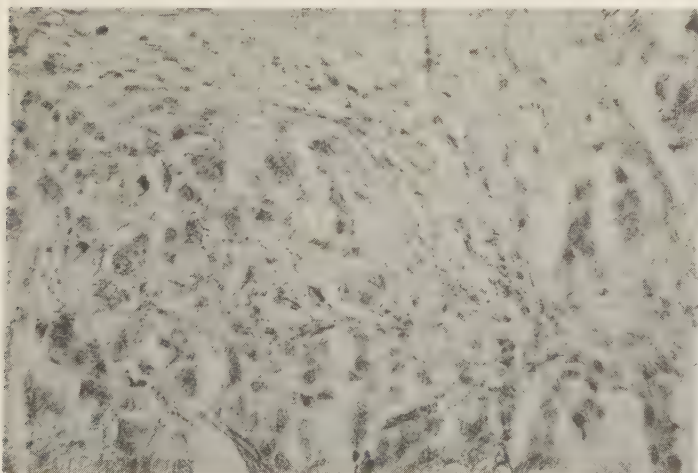


Abb.3.1.1. : negative Kontrolle eines Ca solidum simplex

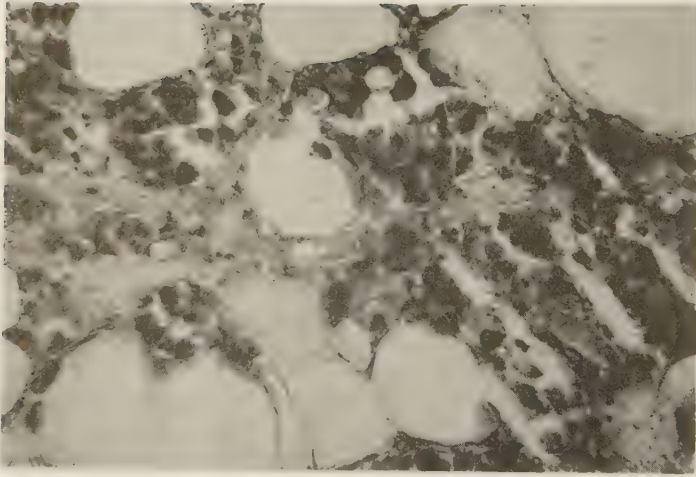


Abb.3.1.2. : stark positive (++) hPL-Färbung des-
selben Tumors wie in Abb.3.1.1.

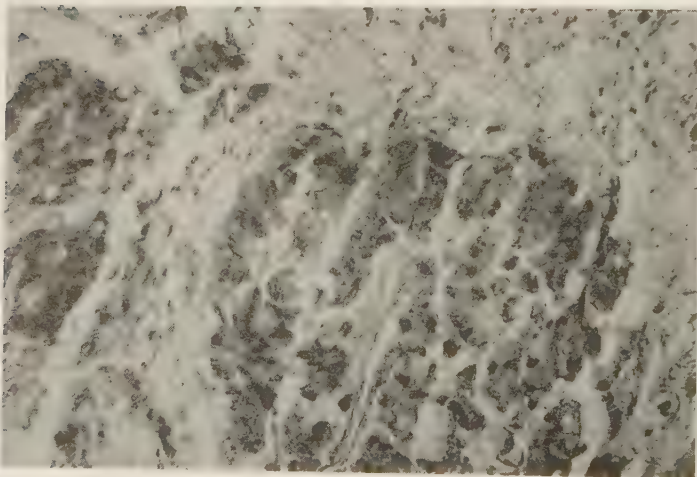


Abb.3.1.3. : stark positive (++) SP1-Färbung des-
selben Tumors wie in Abb.3.1.1.

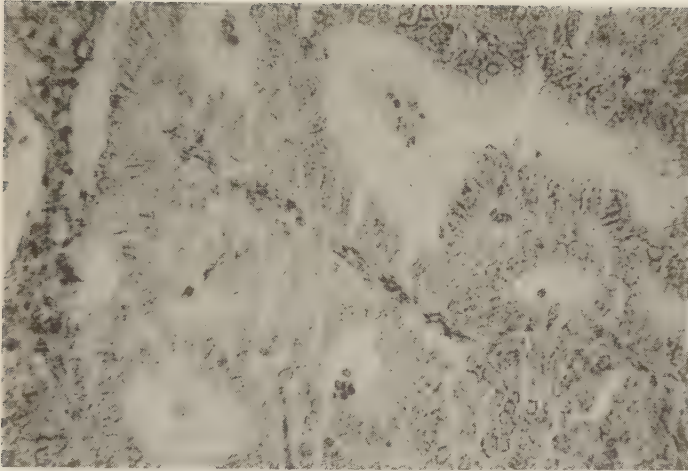


Abb.3.2.1. : negative Kontrolle eines Ca adenosum

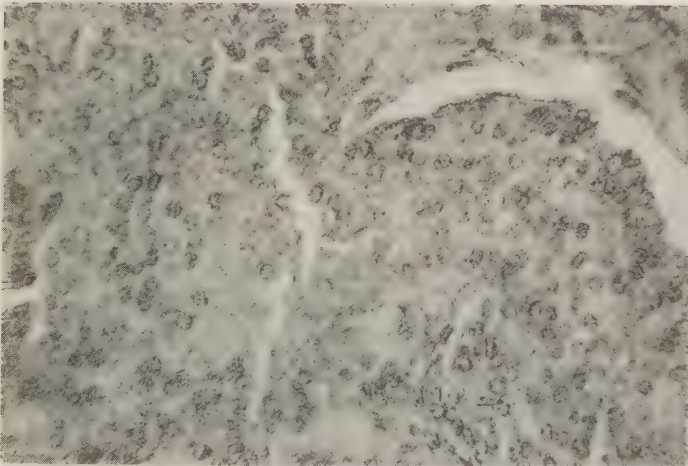


Abb.3.2.2. : schwach positive (+) hPL-Färbung des-
selben Tumors wie in Abb.3.2.1.

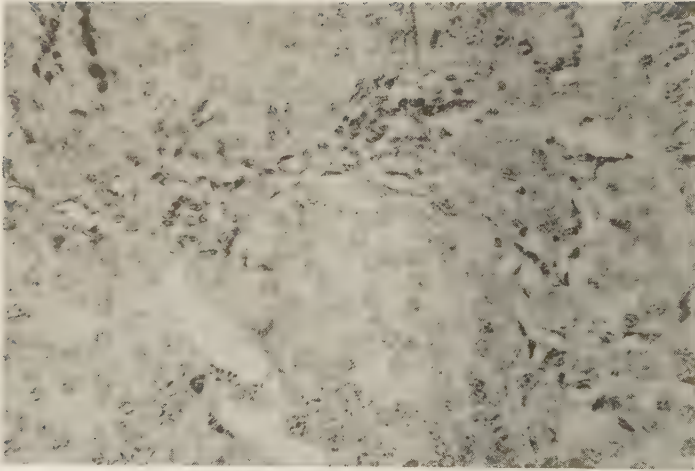


Abb.3.2.3. : negative (-) SP1-Färbung desselben Tumors wie in Abb.3.2.1.

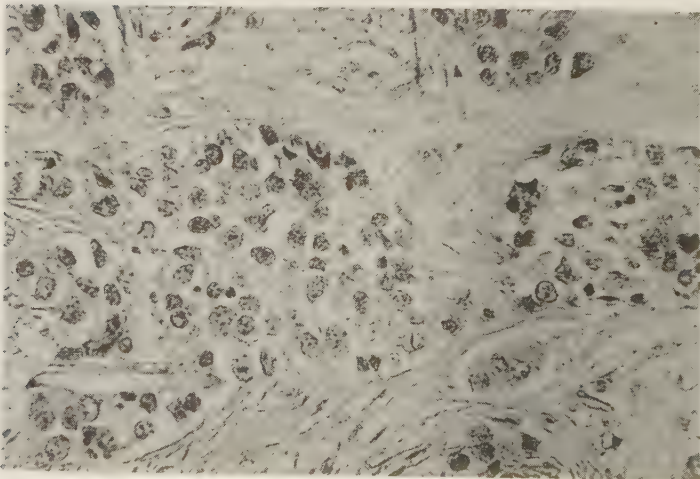


Abb.3.3.1. : negative Kontrolle eines Ca solidum simplex

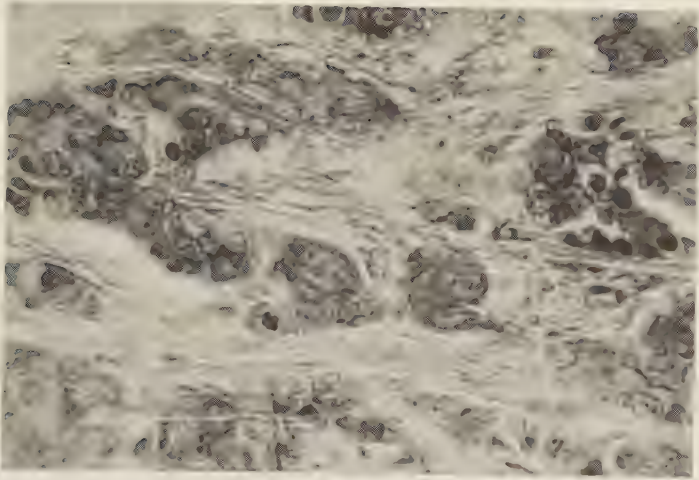


Abb.3.3.2. : stark positive (++) hPL-Färbung des-
selben Tumors wie in Abb.3.3.1.



Abb.3.3.3. : stark positive (++) SP1-Färbung des-
selben Tumors wie in Abb.3.3.1.

urteilung eines der 3 Untersucher um mehr als eine der vier als Arbeitsgrundlage benutzten Beurteilungsstufen (-), (+/-), (+) und (++) (HORNE C.H.W., REID I.N. und MILNE G.D., 1976). Dabei differierte die Beurteilung in 5 Fällen bei der hPL- und SP1-Färbung eines Karzinomschnitts, in 4 weiteren Fällen nur bei der Beurteilung der SP1-Färbung.

3.1.3. Mehrfachfärbungen

Von den insgesamt 64 Karzinomfällen wurden 24 Fälle doppelt und 2 Fälle dreifach bearbeitet und beurteilt. Die dazu benutzten Gewebeproben stammten vom Primärtumor (Probeentnahme), vom Amputationspräparat oder von befallenen axillären Lymphknoten und waren zu verschiedenen Zeitpunkten entnommen worden. Dabei ergaben sich in 6 von 26 Fällen Unterschiede: in 2 Fällen war die hPL-Färbung im einen Schnitt fraglich positiv (+/-) und im anderen schwach positiv (+), in einem Fall waren hPL- und SP1-Färbung im einen Schnitt fraglich positiv (+/-), im anderen schwach positiv (+), in einem Fall waren hPL- und SP1-Färbung im einen Schnitt negativ (-) und im anderen schwach positiv (+), in einem Fall war nur die hPL-Färbung im einen Schnitt negativ (-) und im anderen schwach positiv (+) und in einem Fall war die SP1-Färbung im einen Schnitt negativ (-) und im anderen schwach positiv (+). In 2 Fällen wurden je 3 Gewebeproben einer Patientin gefärbt und beurteilt. Die Färbung stimmte in 3 Schnitten jeweils überein.

3.1.4. Einteilung der Färbeintensität

Ursprünglich war beabsichtigt, die von HORNE und Mitarbeitern getroffene Einteilung in die Färbegrade (-), (+/-), (+) und (++) zu übernehmen. Da aber nach dieser Einteilung Kontrollen in 19 von 92 Fällen fraglich positiv (+/-) waren, wurden negative und fraglich positive Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit als negativ betrachtet, schwach positive und stark positive Ergebnisse

als positiv (zu den Ergebnissen der Anfärbung von Kontrollen, hPL- und SP1-Schnitten vgl. Tabelle 2 und 3 im Anhang).

Um die spezifische Anfärbung der Karzinome genauer und richtiger beurteilen zu können, wurde die Färbe-Intensität von hPL- und SP1-Schnitten auf die zuvor beurteilte Anfärbung des dazugehörigen Kontrollschnitts (negativ oder fraglich positiv) bezogen.

3.2. Vergleichbarkeit des Patientenguts

Die in diese Untersuchung einbezogenen Patientinnen waren zum Zeitpunkt der Tumorexstirpation bzw. Mastektomie zwischen 29 und 65 Jahren alt. Das hier errechnete Durchschnittsalter war 47.9 Jahre. Tatsächlich jedoch nehmen Erkrankungen an Mammakarzinom mit fortschreitendem Alter zu, der in der Literatur angegebene Häufigkeitsgipfel liegt um das 65. Lebensjahr (SCHMIDT-MATTHIEN H., 1975). Zur Altersverteilung und Karzinomanfärbung siehe Abbildung 4.

Um auszuschließen, daß die Produktion von hPL und β 1-Glykoprotein durch das Karzinom im Zusammenhang mit der ovariellen Funktion steht, wurden 2 Gruppen gebildet, wobei sich in der 1. Gruppe nur Patientinnen vor der Menopause befanden und in der 2. Gruppe nur Patientinnen nach der Menopause. Angaben über Prämenopause bzw. Postmenopause waren in 39 Fällen zu erhalten.

Ein Vergleich der beiden Patientengruppen hinsichtlich der Produktion von hPL und β 1-Glykoprotein durch den Tumor zeigt praktisch keinen Unterschied (vgl. dazu Tabelle 4 im Anhang).

Patientinnen in der Prämenopause und Patientinnen in der Postmenopause wurden daher in den folgenden Untersuchungen als eine Gruppe betrachtet.

3.3.0. Prognostische Bedeutung der Tumor-Anfärbbarkeit für hPL und β 1-Glykoprotein

3.3.1. Ergebnisse der Nachforschungen zum Verlauf

Das Schicksal von 63 Patientinnen konnte für den Zeitraum von 5 Jahren zurückverfolgt werden. Bei einer Patientin konnte der weitere Verlauf nach Operation nicht ermittelt werden, da sie bald nach ihrer Operation unbekannt ins Ausland verzog.

Bei 3 Patientinnen konnte das Tumorstadium zum Zeitpunkt der Operation nicht ermittelt werden, bei weiteren 3 Patientinnen nur ihr Tod, nicht aber das Todesdatum.

3.3.2. Anfärbbarkeit der Karzinome

In den Versuchen wurden von 64 Patientinnen Mammakarzinome (92 Gewebeproben), die in Formalin fixiert, in Paraffin eingebettet und anschließend 5 Jahre gelagert worden waren, auf 5 μ m Dicke geschnitten, auf Objektträger aufgezogen und mit Hämalun-Eosin bzw. mit der Immunperoxidase-Enzymbrücken-Methode gefärbt. 16 von 64 Schnitten färbten SP1-positiv, 37 von 64 Schnitten hPL-positiv. SP1-Schnitte waren nur positiv, wenn auch die entsprechenden hPL-Schnitte positiv waren. In nur 3 Fällen färbte SP1 stärker positiv als hPL. In 21 Fällen waren die Schnitte nur für hPL positiv (vgl. hierzu Tabelle 5 im Anhang).

3.3.3. Histologische Klassifizierung und Anfärbbarkeit

Die Mammakarzinome wurden nach Behandlung mit der Immunperoxidase-Enzymbrücken-Methode pathologisch-anatomisch sowie nach Färbegrad beurteilt und nach Tumortyp eingeteilt. Das Verhältnis von angefärbten zu nicht-angefärbten Karzinomen war dabei in allen Gruppen für hPL etwa 2 : 1, für B1-Glykoprotein etwa 1 : 2. Eine Ausnahme bildete das Carcinoma scirrhosum, das seltener hPL- und SP1-positiv färbte. Abbildung 5 zeigt das Verhältnis angefärbter Karzinome zu nicht-angefärbten Karzinomen. Ein Einzelfall wurde in Abbildung 5 nicht berücksichtigt. Seine Anfärbbarkeit ist aus Tabelle 6 ersichtlich (im Anhang).

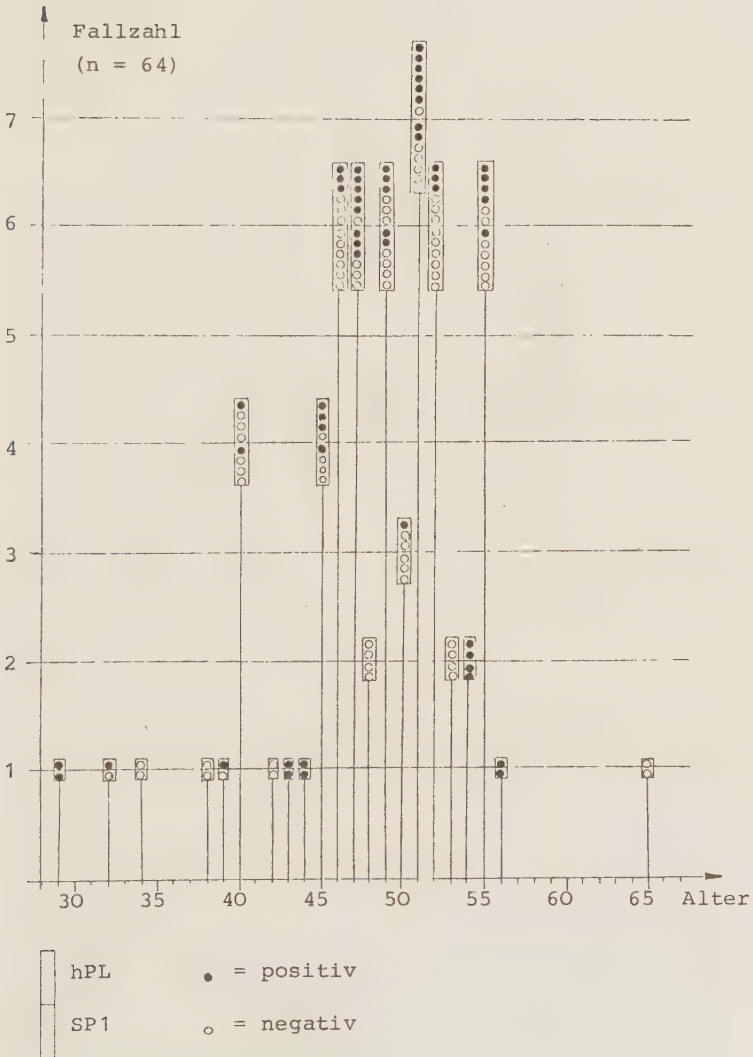


Abb.4: Alter der Patienten und Anfärbbarkeit der
MammaKarzinome für hPL und S1-Glykoprotein

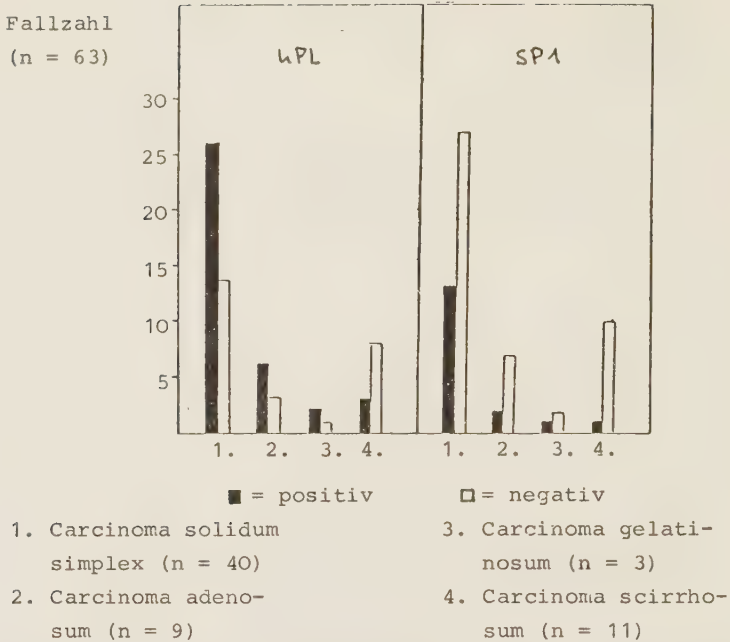


Abb.5: Zuordnung der Anfärbarkeit für hPL und SP1 zum histologischen Tumortyp

3.3.4. Histologischer Karzinomtyp und Überlebensrate

21 von 63 Patientinnen waren im Verlauf der 5 Jahre an den Folgen ihres Karzinoms verstorben.

Um eine mögliche Abhängigkeit der Überlebensrate vom histologischen Tumortyp zu ermitteln, wurden beide Parameter für die einzelnen Primärtumorgrößen (T1-T4) miteinander verglichen (vgl. dazu Tabelle 7 und 8 im Anhang). Aufgrund der - mit Ausnahme von Carcinoma solidum simplex - sehr geringen Fallzahlen ist eine Aussage jedoch nicht möglich. Für Carcinoma solidum simplex kann lediglich die allgemeine Aussage gemacht werden, daß sich die Überlebensrate mit zunehmender Primärtumorgröße verringert.

3.3.5. Anfärbarkeit für hPL und SP1 und Überlebensrate

Vergleicht man Anfärbbarkeit der invasiven Karzinome mit der Überlebensrate, so zeigt sich für Trägerinnen hPL- und SP1-positiver Tumoren eine etwas geringere Überlebensrate als für Trägerinnen hPL- und SP1-negativer Tumoren (vgl. dazu Tabelle 9 im Anhang).

Unterteilt man die Tumoren in die einzelnen histologischen Wachstumsformen, gilt diese Aussage nur noch für Trägerinnen hPL-positiver Tumoren vom Typ Carcinoma solidum simplex, jedoch nicht mehr für Trägerinnen SP1-positiver Karzinome desselben Typs. Für die anderen Wachstumsformen kann diese Aussage wegen der geringen Fallzahl nicht gemacht werden (vgl. hierzu Tabelle 10 im Anhang).

Relativiert wird die Aussage, wenn man Überlebensrate und Anfärbbarkeit der einzelnen Karzinomformen für die jeweilige Primärtumorgröße (T1-T4) betrachtet. Bei Carcinoma solidum simplex ist ein Unterschied in der Überlebensrate von Trägerinnen hPL- und SP1-positiver Karzinome gegenüber Trägerinnen hPL- und SP1-negativer Karzinome nicht mehr festzustellen (vgl. dazu Tabelle 11 im Anhang).

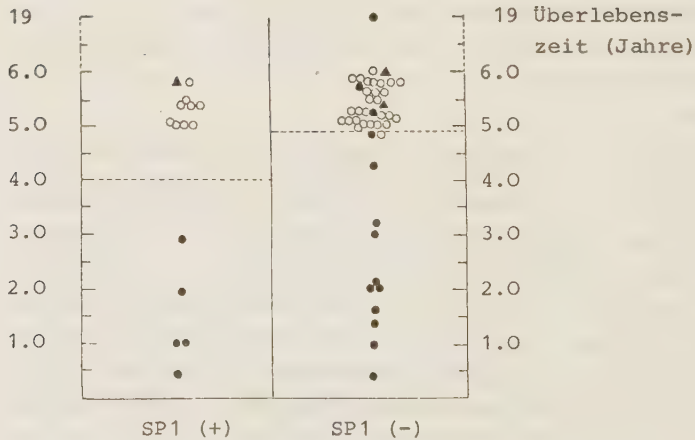
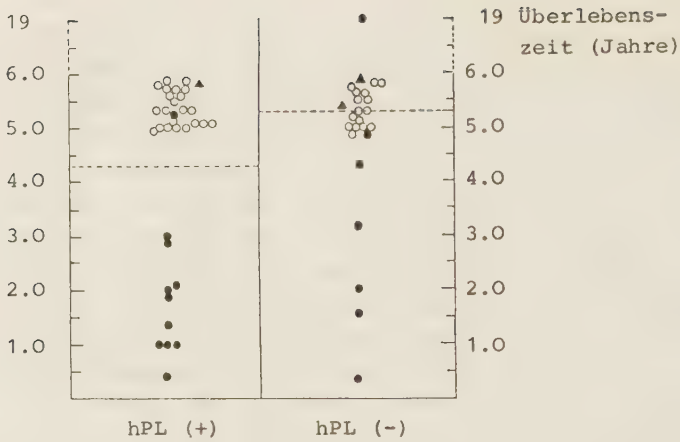
3.3.6. Überlebenszeit der Patientinnen

Überlebenszeiten wurden vom Zeitpunkt der Operation an gerechnet. Sie variierten bei den einzelnen Patientinnen von 5 Monaten bis zu 19 Jahren.

Die mittlere Überlebenszeit von Trägerinnen hPL-positiver Karzinome war bei $n = 60$ Fällen 4.3 Jahre, die von Trägerinnen hPL-negativer Karzinome 5.3 Jahre.

Die mittlere Überlebenszeit von Trägerinnen SP1-positiver Karzinome war bei $n = 60$ Fällen 4.0 Jahre, die von Trägerinnen SP1-negativer Karzinome 4.9 Jahre.

Läßt man den Fall einer Patientin mit der Überlebenszeit von 19 Jahren (Ablatio 1956, Primärtumorgröße T1, 51-jährig an den Folgen ihres Karzinoms gestorben) außer Acht, so ist die mittlere Überlebenszeit bei Trägerinnen hPL-negativer Karzinome 4.7 Jahre, bei Trägerinnen SP1-negativer Karzinome 4.6 Jahre. Siehe dazu Abbildung 6.



● = verstorben ○ = lebend, klinisch gesund
 ▲ = lebend, Fernmetastasen nachgewiesen
 ----- = mittlere Überlebenszeit

Abb.6: Korrelation positiver und negativer Anfärbbarkeit für hPL/SP1 und Überlebenszeit (n = 60)

Vergleicht man die mittlere Überlebenszeit mit der Anfärbbarkeit der Karzinome bezüglich der jeweiligen Primärtumor-Größe (T1-T4), so zeigt sich für das Stadium T2, daß Patientinnen mit hPL- und SPL-negativen Karzinomen gegenüber Patientinnen mit hPL- und SPL-positiven Karzinomen eine höhere Überlebenszeit hatten. Für die anderen Gruppen kann diese Aussage aufgrund der geringen Fallzahl nicht gemacht werden (vgl. dazu Tabelle 12 im Anhang).

3.3.7. Sonstige Ergebnisse

Anhaltspunkte für mögliche Zusammenhänge zwischen hPL- und β 1-Glykoprotein-Produktion und

- Abhängigkeit der Anfärbung vom Tumorstadium
- Rezidivhäufigkeit (15 von 48 Patientinnen) sowie Zeitpunkt des Auftretens vom Rezidiv
- Metastasierung in die axillären Lymphknoten (39 von 61 Fällen) zum Zeitpunkt der Mastektomie
- Fernmetastasen zum Zeitpunkt der Mastektomie (10 von 61 Fällen) und Verlauf nach der Mamma-Amputation
- Erfolg von Chemotherapie (12 von 28 Fällen) oder Hormontherapie (9 von 33 Fällen)

konnten nicht ermittelt werden. Ebenso konnten keine Zusammenhänge zwischen hPL- und SPL-Produktion und

- Menarchenalter (errechnetes Durchschnittsalter 13.7 Jahre)
- ovarieller Funktion (Menopausenalter im errechneten Durchschnitt 49.6 Jahre; siehe auch Kapitel 3.2. Ergebnisse)
- Anzahl der Schwangerschaften und den Stillgewohnheiten ermittelt werden.

4.0. Diskussion

4.1. Immunperoxidase-Enzymbrücken-Methode

Es konnte gezeigt werden, daß man in Karzinomen der menschlichen Brustdrüse ektopisch gebildetes hPL und β 1-Glykoprotein nachweisen kann.

Die Immunperoxidase-Enzymbrücken-Methode ist möglicherweise vergleichbaren Methoden zur Darstellung von intrazellulär liegenden oder an Gewebskomponenten gebundenen Antigenen überlegen. Im Gegensatz zu herkömmlichen Immunfluoreszenz-Methoden kann sie an routinemäßig in Formalin fixierten Geweben durchgeführt werden und ist technisch wenig aufwendig. Sie benötigt kein chemisch konjugiertes Marker-Enzym und vermeidet damit, daß durch die chemische Konjugation möglicherweise entweder die Immunspezifität des Antikörpers oder die Enzymaktivität des Marker-Enzyms beeinträchtigt wird (MA-SON T.E., PHIFER R.F., SPICER S.S., SWALLOW R.A. und DRESKIN R.B., 1969). Vielmehr wird das Marker-Enzym durch Antigen-Antikörper-Reaktion an das eine Ende einer Immunglobulinbrücke gekoppelt, deren anderes Ende ebenfalls durch Antigen-Antikörper-Reaktion mit dem gesuchten Gewebeanantigen verbunden ist. Offenbar erfolgt keine oder nur eine sehr geringe Veränderung der immunologischen Eigenschaften von hPL und β 1-Glykoprotein durch die vorausgegangene Formalinfixierung.

Ein gegen das Marker-Enzym gerichteter Antikörper kann als Globulin wieder von jedem Antikörper gebunden werden, der gegen Globulin dieser Spezies gerichtet ist.

Die mit dieser Methode gefärbten Schnitte zeigen - lichtgeschützt aufbewahrt - auch nach langer Zeit noch keinen Färbeschwund, sodaß Ergebnisse früherer Arbeiten mit solchen zu späterer Zeit leicht verglichen werden können.

Der Nachteil der Immunperoxidase-Enzymbrücken-Methode ist der große Zeitaufwand (6-7 Stunden für Kontrolle, hPL- und SP1-Färbung).

HEYDERMAN und Mitarbeiter (HEYDERMAN E. und NEVILLE A. M., 1977) beschrieben kürzlich eine neue Immunperoxidase-Technik, die in weniger als 2 Stunden durchgeführt werden kann. Da das Marker-Enzym dabei chemisch an den spezifischen Antikörper gekoppelt ist, hat die Methode vielleicht den oben beschriebenen Nachteil der geringen Spezifität bzw. Sensibilität; eigene Erfahrungen mit der neuen Methode liegen nicht vor.

4.2. Unterschiedliche Anfärbbarkeit von hPL- und SP1-Schnitten

In Vorversuchen wurde bei der Beurteilung der Schnitt-Anfärbbarkeit bemerkt, daß hPL-positive Schnitte immer intensiver angefärbt waren als SP1-positive Schnitte (Abbildungen 2 und 3). Es wurde versucht, durch Änderung der Verdünnung von Anti-SP1-Serum die Intensität der Anfärbung zu erhöhen. Da keine Erfolge erzielt wurden, wurde die ursprüngliche Verdünnung von 1:60 (HORNE C.H. W., 1977) beibehalten.

Die unterschiedliche Anfärbbarkeit von hPL- und SP1-Schnitten läßt sich einerseits dadurch erklären, daß hPL im Kaninchen als stärkeres Antigen wirkt als β 1-Glykoprotein, andererseits dadurch, daß der Tumor möglicherweise ein gegenüber Plazenta-SP1 immunologisch verändertes β 1-Glykoprotein produziert. Eine dritte Möglichkeit wäre, daß durch die Fixierung das Glykoprotein stärker beeinträchtigt wird als die Proteinkette von hPL.

4.3. Kontrollen und Mehrfachbestimmungen

In den Kontrollen war spezifisch gegen hPL und β 1-Glykoprotein gerichtetes Kaninchen-Immunglobulin durch unspezifisches Serum nicht-sensibilisierter Kaninchen ersetzt worden. 19 von 92 der in jedem Versuch mitbearbeiteten Kontrollen waren fraglich positiv (+/-). Da HORNE (HORNE C.H.W., REID I.N. und MILNE G.D., 1976) in seiner Veröffentlichung keine Ergebnisse über die Anfärbung von

Kontrollen mitteilte (GAU G. und CHARD T., 1976), jedoch fraglich positive Fälle als positiv bewertete, mußten angesichts der eigenen 19 fraglich positiven Kontrollen im Interesse einer richtigen Beurteilung fraglich positive Fälle als negativ bewertet werden.

Von 64 Karzinomfällen wurden 24 Fälle zweifach und 2 Fälle dreifach gefärbt und beurteilt. Die dazu verwendeten Gewebe stammten vom Primärtumor (Probeentnahme), vom Amputationspräparat oder von befallenen Lymphknoten und waren zu verschiedenen Zeiten entnommen worden. Bei den Mehrfachfärbungen ergab sich in 6 von 26 Fällen unterschiedliche Anfärbbarkeit für hPL und SP1. Es könnte möglich sein, daß die Karzinomzellen im Rahmen der Entdifferenzierung im einen Gewebe noch nicht, im anderen dagegen schon in der Lage waren, eines oder beide der schwangerschaftsspezifischen Proteine zu synthetisieren.

4.4.O. Prognostische Bedeutung der Karzinom-Anfärbbarkeit

4.4.1. Literaturvergleich

Ektopische Produktion von hPL (GASPARD U., HENDRICK J.C., REUTER A.M. und FRANCHIMONT P., 1973; SUSSMAN H.H., ROSEN S.W. und WEINTRAUB B.D., 1971; SUSSMAN H.H., WEINTRAUB B.D., ROSEN S.W., 1974; WEINTRAUB B.D. und ROSEN S.W., 1969; WEINTRAUB B.D. und ROSEN S.W., 1971; SHEETH N.A., SURAIYA J.N., SHEETH A.R., RANADIVE K.J. und JUSSAWALLA D.J., 1977) und β 1-Glykoprotein (HORNE C.H.W., REID I.N. und MILNE G.D., 1976; TATARINOV Yu.S. und SOKOLOV A.V., 1977) konnte in den verschiedensten nicht-trophoblastischen und nicht-gonadalen Tumoren nachgewiesen werden. Ihre Bildung durch Karzinome der menschlichen Brustdrüse wurde dagegen in der Literatur bisher selten beschrieben (GASPARD U., HENDRICK J.C., REUTER A.M. und FRANCHIMONT P., 1973; SHEETH N.A., SURAIYA J.N., SHEETH A.R., RANADIVE K.J. und JUSSAWALLA D.J., 1977; HORNE C.H.W., REID I.N. und MILNE G.D., 1976).

SHEETH und Mitarbeiter wiesen mit Radioimmunoassay (RIA)

in 10 von 72 Fällen hPL im Serum von Frauen nach, die an Brustkrebs erkrankt waren. HORNE und Mitarbeiter konnten mit der Immunperoxidase-Enzymbrücken-Methode hPL in 41 von 50 Mammakarzinom-Fällen nachweisen, SP1 in 38 von 50 Fällen. In der vorliegenden Arbeit waren 37 von 64 Fällen hPL-positiv und 16 von 64 Fällen SP1-positiv (fraglich positive Fälle dabei nicht berücksichtigt).

Rechnet man zum Vergleich der eigenen Ergebnisse mit den Ergebnissen von HORNE und Mitarbeitern fraglich positive Fälle dazu, so waren in der vorliegenden Arbeit 47 von 64 Fällen hPL-positiv und 36 von 64 Fällen SP1-positiv.

Berücksichtigt man dabei die Tatsache, daß die Immunperoxidase-Enzymbrücken-Methode nur eine semiquantitative Beurteilung erlaubt und zudem verhältnismäßig geringe Fallzahlen vorliegen, so kann man von einem recht gut übereinstimmenden Ergebnis sprechen.

4.4.2. Histologischer Karzinomtyp, Anfärbarkeit und Überlebensrate

Alle Karzinom-Wachstumsformen waren mit Ausnahme des Typs Carcinoma scirrhosum zu etwa zwei Dritteln hPL-positiv und zu etwa einem Drittel SP1-positiv. Carcinoma scirrhosum war im Vergleich mit den übrigen Wachstumsformen für hPL und β 1-Glykoprotein seltener positiv. Aufgrund der geringen Fallzahl (11 Fälle mit Carcinoma scirrhosum) sollte die geringere Anfärbarkeit jedoch nur als Tendenz gewertet werden.

Bei der Zuordnung von Tumortyp zur Überlebensrate zeigte sich, daß eine Abhängigkeit der Überlebensrate von der Karzinom-Wachstumsform nicht besteht: betrachtete man die absoluten Zahlen für die einzelnen Karzinomtypen, so schienen Trägerinnen hPL- und SP1-positiver Tumoren zunächst gegenüber Trägerinnen hPL- und SP1-negativer Tumoren eine etwas geringere Überlebensrate zu haben. Durch Aufteilung der Fälle nach Primärtumor-

Größe zeigte sich jedoch, daß dieser Unterschied nur scheinbar vorhanden war.

4.4.3. Überlebenszeit

Patientinnen mit hPL-positiven Karzinomen hatten gegenüber solchen mit hPL-negativen Karzinomen eine um 1 Jahr geringere mittlere Überlebenszeit, Patientinnen mit SP1-positiven Tumoren gegenüber Patientinnen mit SP1-negativen Tumoren eine um 0.9 Jahre geringere mittlere Überlebenszeit. Dieser deutliche Unterschied muß jedoch eingeschränkt werden: eine Patientin, deren Karzinom hPL- und SP1-negativ war, starb 19 Jahre nach der Mamma-Ab-latio 51-jährig an den Folgen ihres Karzinoms. Wird dieser Fall nicht mit in die Berechnung einbezogen - das Schicksal der übrigen Patientinnen wurde nur über den Zeitraum von 5 Jahren zurückverfolgt - , so beträgt der Unterschied in der mittleren Überlebenszeit bei Patientinnen mit hPL-positiven Karzinomen gegenüber solchen mit hPL-negativen Karzinomen nur noch 0.4 Jahre, von Patientinnen mit SP1-positiven Karzinomen gegenüber Patientinnen mit SP1-negativen Karzinomen nur noch 0.6 Jahre.

Unterteilt man das Gesamtpatientengut wieder nach der Primärtumor-Größe, so findet man für das Stadium T2 - dem Stadium mit der größten Fallzahl - , daß Trägerinnen hPL/SP1-positiver Karzinome gegenüber Trägerinnen hPL/SP1-negativer Karzinome eine geringere mittlere Überlebenszeit hatten. Bei der Interpretation dieser Aussage muß jedoch beachtet werden, daß nur 9 der 33 Patientinnen von Stadium T2 verstorben sind und sich die Aussage nur auf diese 9 Patientinnen bezieht.

Vergleicht man im Stadium T2 das Verhältnis der Lebenden zu den Verstorbenen für hPL/SP1-positive und hPL/SP1-negative Karzinome, so sind bei hPL/SP1-positiven Karzinomen nicht mehr Patientinnen verstorben als bei den hPL/SP1-negativen Karzinomen. Im Stadium T2 bestand die Therapie bei allen mit Ausnahme von 2 Patientinnen, deren Karzinom jeweils negativ für hPL und SP1 war, in der

Mastektomie mit Ausräumung der Axilla (bei den 2 Patientinnen wurde die Axilla nicht ausgeräumt).

Die von HORNE und Mitarbeitern (HORNE C.H.W., REID I.N. und MILNE G.D., 1976) getroffene Feststellung, Patientinnen mit SP1-stark positiven (++) Tumoren seien nach 2 Jahren alle verstorben gewesen, kann durch die Ergebnisse dieser Untersuchung nicht bestätigt werden: 5 von 64 Fällen waren nach der ursprünglich als Arbeitsgrundlage benutzten Einteilung in 4 Bewertungsgrade stark positiv (1 mal Primärtumor-Größe T1, 4 mal Primärtumor-Größe T2). 2 dieser Patientinnen starben im ersten bzw. zweiten Jahr nach ihrer Operation, 3 Patientinnen jedoch leben noch nach 5 Jahren, ohne daß bisher Metastasen nachgewiesen werden konnten.

4.4.4. Zur Berechnung einer statistischen Signifikanz

HORNE und Mitarbeiter machten Verlaufsbeobachtungen über 14 Jahre, sie hatten eine relativ höhere Anfärbequote bei den untersuchten Karzinomschnitten und konnten bei Differenzen in der mittleren Überlebenszeit von bis 8 Jahren für Patientinnen mit SP1-negativen Karzinomen nach 8 Jahren eine statistisch signifikant höhere Überlebensrate gegenüber Patientinnen mit SP1-stark positiven Karzinomen errechnen. In der vorliegenden Arbeit wurden Verlaufsbeobachtungen nur über einen Zeitraum von 5 Jahren gemacht. Auch war nach der endgültigen Färbegrad-Einteilung der Anteil an hPL/SP1-positiven Fällen wesentlich geringer als bei HORNE und Mitarbeitern. Daher wurde nicht versucht, statistisch signifikante Unterschiede in den Überlebensraten zu berechnen.

5.0. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob man mit Hilfe der Immunperoxidase-Enzymbrücken-Methode die schwangerschaftsspezifischen Proteine human placental lactogen (hPL) und humanes β 1-Glykoprotein (SP1) in Mammakarzinomen darstellen kann und ob sich Zusammenhänge ergeben zwischen dem Auftreten der beiden Proteine in Mammakarzinomen und der Überlebenszeit der Patienten.

64 Mammakarzinom-Fälle wurden untersucht und retrospektiv der Verlauf während eines Zeitraums von 5 Jahren nach der Operation ermittelt.

Es konnte bestätigt werden, daß die Immunperoxidase-Enzymbrücken-Methode geeignet ist, die ektopische Produktion bestimmter Proteine im Tumorgewebe nachzuweisen. Offensichtlich kommt es zu einer viel häufigeren Produktion dieser Proteine als in Untersuchungen mit Radioimmunoassay (RIA) im Serum von Karzinomträgern bisher nachgewiesen werden konnte.

Wie hier gezeigt wurde, ist ektopische Produktion von hPL und β 1-Glykoprotein unabhängig von der Wachstumsform des Karzinoms und auch unabhängig von der ovariellen Funktion.

Bezogen auf einen Beobachtungszeitraum bis zu 5 Jahren konnte nicht bestätigt werden, daß durch den Nachweis dieser Proteine, von denen eine immunsuppressive Wirkung angenommen wird, eine prognostische Aussage für den Karzinomträger möglich ist.

6.O.Addendum

Die zur Auswertung gekommenen Patientinnen sind einer laufenden Studie über Ovulationshemmer-abhängige Mammaerkrankungen, die von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG Pr 101/1 - 6) unterstützt wird, in Zusammenarbeit mit Herrn Prof.Dr.med.K.Prechtel (Pathologisches Institut der Universität München/Pathologie Starnberg) entnommen worden.

Danksagung

Ich möchte mich sehr herzlich bedanken bei Dr.med.Wolfgang Eiermann, der mich bei dieser Arbeit freundschaftlich und hilfsbereit angeleitet hat, bei Herrn Prof.Dr.med.Klaus Prechtel, der die pathologisch-anatomische Diagnose festlegte, die Schnittfärbungen mitbeurteilte und für meine Sorgen ein offenes Ohr hatte. Nicht zuletzt auch bei Frau Mara Rauch, die mich in die Geheimnisse der histologischen Technik einweihte und immer eine Lösung parat hatte, wenn es notwendig wurde.

7.0. Literaturverzeichnis

ALFONSO J.F. und FARNHAM N.G.

Studies of a new electrophoretic zone in labour and the puerperium and in newborn infants.

Amer.J.Obstetr.Gynec. 84, 199 (1962)

ALFONSO J.F. und ALVAREZ R.R. de

Further starch gel fractionation of new protein zones in pregnancy.

Amer.J.Obstetr.Gynec. 86, 815 (1963)

ALOJ S.M., EDELHOCH H., HANDWERGER S. und SHERWOOD L.M.

Correlations in the structure and function of human placental lactogen and human growth hormone.

Endocrinology 91, 728 (1972)

AMATRUDA T.T., UPTON J.R. und UPTON G.V.

Hyperadrenocorticism and ACTH-releasing-factor.

Ann.New York Acad.Sciences 230, 168 (1974)

APFFEL C.A. und PETERS J.H.

Tumours and serum glycoproteins. The "symbolies".

Progr.exp.Tumor.Res. (Basel) 12, 1 (1969)

AVREAMAS S. und TERNYNCK T.

The cross-linking of proteins with glutaraldehyde and its use for the preparation of immunoadsorbants.

Immunochemistry 6, 53 (1969)

BECK C., LARKINS R.G., MARTIN T.J. und BURGER H.G.

Stimulation of growth hormone release from superfused rat pituitary by extracts of hypothalamus and of human lung tumours.

J.Endocrinology 59, 325 (1973)

BECKER K.L., COTTRELL J.C., MOORE C.F. et al

Endocrine studies in a patient with a gonadotropin-secreting bronchogenic carcinoma.

J.Clin.Endocrinol.Metabol. 28, 809 (1968)

BEHRLE F.C., MANTZ F.A., OLSON R.L. et al

Virilization accompanying hepatoblastoma.

Pediatrics 32, 256 (1963)

BERG K. und BEARN A.G.

An inherited X-linked serum system in man.

J.exp.Med. 123, 379 (1966)

BILLINGHAM R.E.

Transplantation immunity and the maternal-fetal relation.

New Engl.J.Med. 270, 667 (1964)

BILLINGHAM R.E. und BEER E.A.

Transplantationsimmunität im Uterus.

Umschau 71(20), 752 (1971)

BOHN H.

Nachweis und Charakterisierung von Schwangerschafts-proteinen in der menschlichen Plazenta, sowie ihre quantitative immunologische Bestimmung im Serum schwangerer Frauen.

Arch.Gynäk. 210, 440 (1971)

BOHN H.

Isolierung und Charakterisierung des schwangerschafts-spezifischen β 1-Glykoproteins.

Blut 24, 292 (1972)

BOHN H. und KRANZ T.

Untersuchungen über die Bindung von Steroidhormonen
an menschliche Schwangerschaftsproteine.

Arch.Gynäk. 215, 63 (1973)

BOHN H.

Untersuchungen über das schwangerschaftsspezifische
 β 1-Glykoprotein (SP1).

Arch.Gynäk. 216, 347 (1974)

BOHN H. und WEINMANN E.

Immunologische Unterbrechung der Schwangerschaft bei
Affen mit Antikörpern gegen das menschliche schwanger-
schaftsspezifische β 1-Glykoprotein (SP1).

Arch.Gynäk. 217, 209 (1974)

BOHN H.

Die Antigene der menschlichen Plazenta.

Klin.WoSchr. 53, 547 (1975)

BOHN H. und SEDLACEK H.

Eine vergleichende Untersuchung von plazentaspezifi-
schen Proteinen bei Mensch und subhumanen Primaten.

Arch.Gynäk. 220, 105 (1975)

BOHN H., SCHMIDTBERGER R. und ZILG H.

Isolierung des schwangerschaftsspezifischen β 1-Glyko-
proteins (SP1) und antigenverwandter Proteine durch
Immunadsorption.

Blut 32, 103 (1976)

BOWER B.F., MASON D.M. und FORSHAM P.H.

Bronchogenic carcinoma with inappropriate antidiuretic
activity in plasma and tumour.

New Engl.J.Med. 271, 934 (1964)

BRAUNSTEIN G.D., VAITUKAITIS J.L., CARBONE P.P.
und ROSS G.T.

Ectopic production of human chorionic gonadotropin
by neoplasmas.

Ann.Intern.Med. 78, 39 (1973)

BUNDSCHUH G.

Xh - ein genetisch determiniertes alpha2-Globulin.

Acta biol.med. germ. 17, 349 (1966)

BUNDSCHUH G., RITTNER C., BAYER H. und GESERICK G.

Serologisch-immunologische Untersuchungen zum Ver-
gleich der Reaktionsweise von Anti-Xh und sogenann-
te Anti-Schwangerenserum von Ziege und Kaninchen.

Zbl.Gyn. 89, 1825 (1967)

CHAMBERS W.L.

Adrenal cortical carcinoma in a male with excess-
gonadotropin in the urine.

J.Clin.Endocrinol.Metabol. 9, 451 (1949)

CONTRACTOR S.F. und DAVIES H.

Effect of human chorionic somatomammotropin and
human chorionic gonadotropin on phytohaemagglutinin-
induced lymphocyte transformation.

Nature New Biology 243, 284 (1973)

COONS A.H., CREECH H.J. und JONES R.N.

Immunological properties of an antibody containing a
fluorescent group.

Proc.Soc.exp.Biol. (New York) 47, 200 (1941)

COONS A.H.

Histochemistry with labelled antibodies.

Int.Rev.Cytol. 5, 1 (1956)

COOPER D.W.

A serum protein present in pregnant women.

Nature (London) 200, 892 (1963)

CREGER W.P. und STEELE M.R.

Human fetal passage of erythrocytes.

New Engl.J.Med. 256, 158 (1957)

DAILEY J.E. und MARCUSE P.M.

Gonadotropin secreting giant cell carcinoma of the lung.

Cancer 24, 388 (1969)

DAVEY F.R. und BUSCH G.J.

Immunohistochemistry of glomerulonephritis using horseradish peroxidase and fluoreszein-labelled antibody: a comparison of two techniques.

Amer.J.Clin.Pathol. 53, 531 (1970)

DESAI R.G. und CREGER W.P.

Maternofetal passage of leucocytes and platelets in man.

Blood 21, 665 (1963)

DOUGLAS G.W., THOMAS L., CARR M., CULLEN N.M. und MORRIS R.

Trophoblast in circulating blood during pregnancy.

Amer.J.Obstetr.Gynec. 78, 960 (1959)

EIERMANN W. und LINK A.

Nicht veröffentlichte Ergebnisse, 1977

EL TOMI A.E.F., BOOTS L. und STEVENS V.C.

Effects of antibodies to human placental lactogen on reproduction in pregnant rats.

Endocrinology 88, 805 (1971)

FAIMAN C., COLWELL J.A., RYAN R.J. et al

Gonadotropin secretion from a bronchogenic carcinoma.

Demonstration by radioimmunoassay.

New Engl.J.Med. 277, 1395 (1967)

FLORINI J.R., TONELLI G., BREUER C.P., COPPOLA J.

und RINGLER J.

Characterization and biological effects of purified placental protein (human).

Endocrinology 79, 692 (1966)

FRIESEN H.G.

Purification of a placental factor with immunological and chemical similarity to human growth hormone.

Endocrinology 76, 396 (1965)

FUSCO F.D. und ROSEN S.W.

Gonadotropin-producing anaplastic large-cell carcinomas of the lung.

New Engl.J.Med. 275, 507 (1966)

GASPARD U., HENDRICK J.C., REUTER A.M. und FRANCHIMONT P.

Dosage radio-immunologique de l'hormone chorionique somatomammotrope humaine (HCS) per les immunoabsorbants-anticorps: son application à la clinique obstetricale et à la recherche des secretions hormonales ectopiques.

Ann.Biol.Clin. (Paris) 31, 447 (1973)

GAU G. und CHARD T.

Pregnancy proteins in breast cancer (letter to the editor).

Lancet 18, 627 (1976)

GRUMBACH M.M., KAPLAN S.L., SCIARRA J.J. und BURR I.M.

Chorionic growth hormone-prolactin (CGP): secretion, disposition, biological activity in man, and postulated function as the "growth-hormone" of the second half of pregnancy.

Ann.New York Acad.Sciences 148, 501 (1968)

GUSDON J.P.

An immunological method of pregnancy destruction and contraception.

Amer.J.Obstetr.Gynec. 112, 472 (1972)

HAAGENSEN C.D.

Diseases of the breast.

Philadelphia 1971, p. 618 ff

HANDWERGER S., PANG E.C., ALOJ S.M. und SHERWOOD L.M.

Correlations in the structure and function of human placental and human growth hormone.

Endocrinology 91, 721 (1972)

HELLSTRÖM K.E., HELLSTRÖM I. und BRAUN J.

Abrogation of cellular immunity to antigenically foreign mouse embryonic cells by a serum factor.

Nature (London) 224, 914 (1969)

HEYDERMAN E. und NEVILLE A.M.

A shorter immunoperoxidase technique for the demonstration of carcinoembryonic antigen and other cell products.

J.Clin.Pathol. 30, 138 (1977)

HIGGINS G.A., BROWNLEE W.E. und MANTZ F.A.Jr.

Feminizing tumours of the adrenal cortex.

Amer.Surg. 22, 56 (1956)

HORNE C.H.W., REID I.N. und MILNE G.D.

Prognostic significance of inappropriate production of pregnancy proteins by breast cancers.

Lancet 7, 279 (1976)

HORNE C.H.W.

Persönliche Mitteilung, 1977

HUNG W., BLIZZARD R.M., MIGEON C.J. et al

Precocious puberty in a boy with hepatoma and circulating gonadotropin.

Pediatrics 63, 895 (1963)

JOHANNSEN R., HAUPT H., BOHN H., HEIDE K., SEILER F.R. und SCHWICK H.G.

Inhibition of the mixed leucocyte culture (MLC) by proteins: mechanism and specificity of the reaction.

Immun.Forsch.-Immunobiology 152, 280 (1976)

JOSIMOVICH J.B. und MACLAREN J.A.

Presence in the human placenta and term serum of a highly lactogenic substance immunologically related to pituitary growth hormone.

Endocrinology 71, 209 (1962)

KIRBY D.R.S., BILLINGTON W.D., BRADBURY S. und GOLDSTEIN D.J.

Antigen barrier of the mouse placenta.

Nature 204, 548 (1964)

KUCZYNSKI J.W.

Immunochemische Untersuchungen über das Schwangerschaftsprotein.

Posz.Towarzy Przyiac.Nauk.Wydz.lek.,Prace Kom.Med. doświad. 39, 165 (1969)

LEE J., JONES J.J. und BARRACLOUGH M.A.

Inappropriate secretion of vasopressin.

Lancet 4, 792 (1964)

LI C.H., GRUMBACH M.M., KAPLAN S.L., JOSIMOVICH J.B. et al

Human chorionic somatomammotropin (HCS), proposed terminology for designation of a placental hormone. Experientia 24, 1288 (1968)

LI C.H., DIXON J.S. und CHUNG D.

Primary structure of the human chorionic somatomammotropin (HCS) molecule.

Science 173, 56 (1971)

LI C.H., DIXON J.S. und CHUNG D.

Amino acid sequence of human chorionic somatomammotropin.

Arch.Biochem.Biophys. 155, 95 (1973)

LIDDLE G.W., ISLAND D. und MEADOR C.K.

Normal and abnormal regulation of Corticotropin secretion in man.

Rec.Progr.Hormone Res. 18, 125 (1962)

LIPSETT M.B., ODELL W.D., ROSENBERG L.E. et al

Hormonal syndromes associated with nonendocrine tumours. Ann.Intern.Med. 61, 733 (1964)

MACNAB G.H., MONCRIEFF S.A. und BUDIAN M.

Primary malignant hepatic tumours in childhood.
Brit. Empire Cancer Campaign 30th Ann. Rep. Eastbourne,
Sussex, Sumfield & Day, Ltd. p.168 (1952)

McFADZEAN A.J.S.

Feminization associated with carcinoma of the adrenal
cortex.

Lancet 2, 940 (1946)

MASON T.E., PHIFER R.F., SPICER S.S., SWALLOW R.A.
und DRESKIN R.B.

An immunoglobulin-enzymbridge-method for localizing
tissue antigens.

J. Histochem. Cytochem. 17, 563 (1969)

MOCHIZUKI M., TOKURA Y. und TOKURA T. et al

Biochemical properties of gonadotropin-like substance
secreted by lung carcinoma.

Acta Obstetr. Gynecol. Jap. 16, 180 (1969)

MOORE T.L., KUPCHIK H.Z., MARCON N. und ZAMCHEK N.

Carcinoembryonic antigen assay in cancer of the colon
and pancreas and other digestive tract disorders.

Amer. J. Digest. Disease 16, 1 (1971)

NAKANE P.K. und PIERCE G.B. Jr.

Enzyme-labelled antibodies: preparation and applica-
tion for the localisation of antigens.

J. Histochem. Cytochem. 14, 929 (1966)

NAKANE P.K.

Simultaneous localisation of multiple tissue antigens
using the peroxidase-labelled antibody-method: a study
on pituitary glands of the rat.

J. Histochem. Cytochem. 16, 557 (1968)

PAVLOU C., CHARD T. und LETCHWORTH A.T.

Circulating levels of human chorionic somatomammotropin in late pregnancy: disappearance from the circulation after delivery, variation during labour, and circadian variation.

J.Obstetr.Gynec.Brit.Commonw. 79, 629 (1972)

PETTS V. und ROITT I.M.

Peroxidase conjugates for demonstration of tissue antibodies: evaluation of the technique.

Clin.exp.Immunol. 9, 407 (1971)

REEVES R.L., TESLUK H. und HARRISON C.E.

Precocious puberty associated with hepatoma.

J.Clin.Endocrinol.Metabol. 19, 1651 (1959)

ROCHMAN H., VARNAVIDES L.A. und HAWLEY P.R.

The degradation of human placental lactogen in normal and nephrectomized dogs.

J.Endocrinol. 53, 407 (1972)

ROMEIS B.

Mikroskopische Technik

R.Oldenbourg-Verlag München-Wien 1968

ROOT A.W., BOGIOVANNI A.M. und EBERLEIN W.R.

A testicular-interstitiell-cell-stimulating gonadotropin in a child with hepatoblastoma and sexual precocity.

J.Clin.Endocrinol.Metabol. 28, 1317 (1968)

ROSE L.I., WILLIAMS G.H., JAGGER P.I. et al

Feminizing tumour of the adrenal gland with positive "chorionic-like" gonadotropin test.

J.Clin.Endocrinol.Metabol. 28, 903 (1968)

ROSEN S.W., BECKER C.E., SCHLAFF S., EASTON J. und
GLUCK M.C.

Ectopic gonadotropin production before clinical recognition of bronchogenic carcinoma.

New Engl.J.Med. 279, 640 (1968)

ROSEN S.W., WEINTRAUB B.D., VAITUKAITIS J.L., SUSSMAN H.H., HERSHMAN J.M. und MIGGIA F.M.

Placental proteins and their subunits as tumour markers.

Ann.Int.Med. 82, 71 (1975)

ROUSLAHTI E. und SEPPÄLÄ M.

Normal and increased alpha-fetoprotein in neoplastic and nonneoplastic liver disease.

Lancet 2, 278 (1972)

SAINTE-MARIE G.

A paraffin embedding technique for studies employing immunofluorescence.

J.Histochem.Cytochem. 10, 250 (1962)

SAMAAN N.A., SMITH J.P., RUTLEDGE F.N. und SCHULTZ P.N.

The significance of measurement of human placental lactogen, human chorionic gonadotropin, and carcinoembryonic antigen in patients with ovarian carcinoma.

Amer.J.Obstetr.Gynec. 126, 186 (1976)

Schema zur Klassifikation des Mammakarzinoms.

Therap.Umschau 33, 768 (1976)

SCHLESINGER M.

Uterus of rodents as site for manifestation of transplantation immunity against transplantable tumours.

J.nat.Cancer Inst. 28, 927 (1962)

SCHMIDT-MATTHIESEN H.

Gynäkologie und Geburtshilfe.

F.K.Schattauer-Verlag Stuttgart-New York 1975, p.119

SHEETH N.A., SURAIYA J.N., SHEETH A.R., RANADIVE K.J.
und JUSSAWALLA D.J.

Ectopic production of human placental lactogen by
human breast tumours.

Cancer 39, 1693 (1977)

SHERWOOD L.M., HANDWERGER S., McLaurin W.D. und
LANNER M.

Amino-acid sequence of human placental lactogen.

Nature New Biology 233, 59 (1971)

SINGER W., DESJARDINS P. und FRIESEN H.G.

Human placental lactogen. An index of placental
function.

Obstetr.Gynecol. 36, 222 (1970)

SMITHIES O.U.

Zone electrophoresis in starch gels and its application
to studies of serum proteins.

Advance Protein Chem. 14, 65 (1959)

STREEFKERK J.G.

Inhibition of erythrocyte pseudoperoxidase activity by
treatment with hydrogen peroxide following methanol.

J.Histochem.Cytochem. 20, 829 (1972)

SUSSMAN H.H., ROSEN S.W. und WEINTRAUB B.D.

Discordant secretion of placental alkaline phosphatase
(PAP) and chorionic gonadotropin (hCG) and somatomammo-
tropin (hCS) in patients with cancer.

Clin.Research 19, 497 (1971) (abstract)

SUSSMAN H.H., WEINTRAUB B.D. und ROSEN S.W.

Relationship of ectopic placental alkaline phosphatase to ectopic chorionic gonadotropin and placental lactogen. Discordance of three markers for cancer.

Cancer 33, 820 (1974)

TATARINOV Yu.S. und MASYUKEVICH V.N.

Immunochemischer Nachweis eines neuen β_1 -Globulins.

Byull.éxsp.Biol.Med. 69, 66 (1970)

TATARINOV Yu.S., FALALEEVA D.M. und KALASHNIKOV V.V.

Human pregnancy specific beta1-glycoprotein and its relation to chorioepithelioma.

Int.J.Cancer 17, 626 (1976)

TATARINOV Yu.S., FALALEEVA D.M., KALASHNIKOV V.V.
und TOLOKNOV B.O.

Immunofluorescent localisation of human pregnancy-specific β -globulin in placenta and chorioepithelioma.

Nature 260, 263 (1976)

TATARINOV Yu.S. und SOKOLOV A.V.

Development of a radioimmunoassay for pregnancy-specific beta1-globulin and its measurement in serum of patients with trophoblastic and nontrophoblastic tumours.

Intern.J.Cancer 19, 161 (1977)

TATRA G., POLAK S. und PLACHETA P.

Konzentration des schwangerschaftsspezifischen Proteins SP-1 im Fruchtwasser bei normalen und pathologischen Schwangerschaften.

Arch.Gynäk. 221, 161 (1976)

TATRA G., TEMPFER H. und PLACHETA P.

Influence of blood glucose levels on serum concentrations of pregnancy specific protein SP-1 and hPL during the last trimester of pregnancy.

Europ.J.Obstetr.Gynec.Reprod.Biol. 6/2, 53 (1976)

TAYLOR C.R.

The nature of REED-STERMBERG cells and other malignant "reticulum" cells.

Lancet 5, 802 (1974)

TAYLOR C.R. und BURNS J.

The demonstration of plasma cells and other immunoglobulin-containing cells in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues using peroxidase-labelled antibody.

J.Clin.Pathol. 27, 14 (1974)

WEINTRAUB B.D. und ROSEN S.W.

Human placental lactogen production by undifferentiated carcinomas of the lung.

Clin.Research 17, 47 (1969) (abstract)

WEINTRAUB B.D. und ROSEN S.W.

Ectopic production of human chorionic somatomammotropin by nontrophoblastic cancers.

J.Clin.Endocrinol.Metabol. 32, 94 (1971)

WEINTRAUB B.D. und ROSEN S.W.

Competitive radioassays and "specific" tumour markers. Metabolism 22, 1119 (1973)

WEIR E.E., PRETLOW T.G. und PITTS A.

Destruction of endogenous peroxidase activity in order to locate cellular antigens by peroxidase-labelled antibody.

J.Histochem.Cytochem. 22, 51 (1974)

YLIKORKALA O.

Maternal serum hPL levels in normal and complicated pregnancy as an index of placental function.

Acta Obstetr.Gynec.Scand.Suppl. 26, 22 (1973)

ANHANG

Abbildung 7

Tabellen 1 - 13

Tabelle 1.1.: Gesamtpatientengut, mit endgültiger Anfärbungseinteilung in hPL/SP1-positive und-negative Fälle.
Geordnet nach laufender Journalnummer (JN), Alter zum Operationszeitpunkt (Jahre), Pathologisch-anatomischer Diagnose und Anfärbbarkeit des Mammakarzinoms für human placental lactogen (hPL) und β 1-Glykoprotein (SP1).

JN	Alter	Path.-anat.Diagnose	hPL	SP1
203/72	47	Ca sol simplex	+	-
246/72	55	Ca sol simplex	+	-
536/72	56	Ca gelatinosum	+	+
1601/72	45	Ca sol simplex	+	-
(130 85/72)				
1730/72	51	Ca adenosum	+	-
2631/72	46	Ca sol simplex	+	-
(3007/72)				
2820/72	29	Ca sol simplex	+	+
(2898/72)				
3240/72	46	Ca sol simplex	-	-
3353/72	40	Ca sol simplex	+	+
3428/72	52	Ca sol simplex	+	-
4383/72	34	Ca sol simplex	-	-
(4838/72)				
4687/72	32	Ca sol simplex	+	-
4976/72	55	Ca scirrhosum	+	-
(4991/72)				
5043/72	50	Ca adenosum	+	-
5424/72	52	Ca scirrhosum	+	-
(127 07/72)				
6073/72	65	Ca sol simplex	-	-
(6639/72)				
6310/72	54	Ca sol simplex	+	+
(6409/72)				

JN	Alter	Path.-anat.Diagnose	hPL	SP1
7525/72	42	Ca sol simplex	-	-
8047/72	51	Ca sol simplex	+	+
8466/72	49	Ca adenosum	-	-
(8555/72)				
9075/72	47	Ca sol simplex	+	+
9285/72	49	Ca sol simplex	+	+
9313/72	46	Ca sol simplex	-	-
9664/72	51	Ca sol simplex	+	-
111 95/72	53	Ca scirrhosum	-	-
117 64/72	40	Ca sol simplex	-	-
118 94/72	49	Ca sol simplex	+	-
128 48/72	51	Ca sol simplex	+	+
(130 91/72)				
129 73/72	55	Ca adenosum	+	-
140 28/72	52	Ca scirrhosum	-	-
(150 22/72)				
142 31/72	53	Ca sol simplex	-	-
(153 06/72)				
144 21/72	52	Ca sol simplex	+	-
(146 35/72)				
144 29/72	55	Ca sol simplex	+	+
(153 25/72)				
147 19/72	55	Ca scirrhosum	-	-
149 92/72	45	Ca sol simplex	-	-
151 55/72	47	Ca sol simplex	+	-
(152 35/72)				
154 46/72	47	Ca scirrhosum	+	+
(154 66/72)				
(155 63/72)				
163 06/72	43	Ca sol simplex	+	+
(166 35/72)				
164 41/72	46	Ca scirrhosum	-	-
165 17/72	49	Ca sol simplex	+	+
165 96/72	46	Ca sol simplex	+	-

JN	Alter	Path.-anat.Diagnose	hPL	SP1
166 60/72	45	Ca sol simplex	+	-
170 50/72	45	Ca adenosum	+	+
176 33/72	50	Ca scirrhosum	-	-
(177 60/72)				
176 95/72	51	Ca gelatinosum	+	-
(182 56/72)				
179 51/72	47	Ca sol simplex	-	-
188 88/72	38	Ca sol simplex	-	-
(190 45/72)				
K 70/72	49	Ca sol simplex	-	-
K 398/72	54	Ca adenosum	+	+
K 1179/72	52	Ca sol simplex	-	-
K 2308/72	50	Ca sol medullare	-	-
K 2317/72	48	Ca scirrhosum	-	-
(K 2317/72)				
(K 2628/72)				
K 2395/72	44	Ca sol simplex	+	+
(K 5589/72)				
K 2429/72	51	Ca sol simplex	+	-
K 2552/72	48	Ca gelatinosum	-	-
K 2847/72	40	Ca sol simplex	-	-
(K 2901/72)				
K 3322/72	51	Ca scirrhosum	-	-
(K 3363/72)				
K 3342/72	40	Ca sol simplex	-	-
K 3546/72	47	Ca sol simplex	+	+
(K 3806/72)				
K 4385/72	46	Ca sol simplex	+	-
K 5287/72	49	Ca adenosum	-	-
K 5419/72	39	Ca adenosum	+	-
(K 5462/72)				
K 7316/72	52	Ca adenosum	-	-
K 7847/72	55	Ca scirrhosum	-	-

Tabelle 1.2.: Gesamtpatientengut, mit vorläufiger Anfärbungseinteilung in hPL/SP1-positive und-negative Fälle.
Geordnet nach laufender Journalnummer (JN), Alter zum Operationszeitpunkt (Jahre), Pathologisch-anatomischer Diagnose und Anfärbbarkeit des Mammakarzinoms für human placental lactogen (hPL) und β 1-Glykoprotein (SP1).

JN	Alter	Path.-anat.Diagnose	hPL	SP1
203/72	47	Ca sol simplex	+	+/-
246/72	55	Ca sol simplex	+	+/-
536/72	56	Ca gelatinosum	+	++
1601/72	45	Ca sol simplex	+	+/-
(130 85/72)				
1730/72	51	Ca adenosum	+	-
2631/72	46	Ca sol simplex	++	+/-
(3007/72)				
2820/72	29	Ca sol simplex	++	+
(2898/72)				
3240/72	46	Ca sol simplex	+/-	-
3353/72	40	Ca sol simplex	++	+
3428/72	52	Ca sol simplex	+	+/-
4383/72	34	Ca sol simplex	+/-	+/-
(4838/72)				
4687/72	32	Ca sol simplex	+	+/-
4976/72	55	Ca scirrhosum	+	-
(4991/72)				
5043/72	50	Ca adenosum	+	-
5424/72	52	Ca scirrhosum	++	+/-
(12707/72)				
6073/72	65	Ca sol simplex	-	-
(6639/72)				
6310/72	54	Ca sol simplex	+	++
(6409/72)				

JN	Alter	Path.-anat.Diagnose	hPL	SP1
7525/72	42	Ca sol simplex	-	-
8047/72	51	Ca sol simplex	+	+
8466/72	49	Ca adenosum	+/-	-
(8555/72)				
9075/72	47	Ca sol simplex	++	+
9285/72	49	Ca sol simplex	++	+
9313/72	46	Ca sol simplex	-	-
9664/72	51	Ca sol simplex	+	+/-
111 95/72	53	Ca scirrhosum	-	-
117 64/72	40	Ca sol simplex	+/-	+/-
118 94/72	49	Ca sol simplex	+	-
128 48/72	51	Ca sol simplex	++	+
(130 91/72)				
129 73/72	55	Ca adenosum	+	-
140 28/72	52	Ca scirrhosum	+/-	+/-
(150 22/72)				
142, 31/72	53	Ca sol simplex	-	-
(153 06/72)				
144 21/72	52	Ca sol simplex	+	+/-
(146 35/72)				
144 29/72	55	Ca sol simplex	+	+
(153 25/72)				
147 19/72	55	Ca scirrhosum	+/-	-
149 92/72	45	Ca sol simplex	-	-
151 55/72	47	Ca sol simplex	+	+/-
(152 35/72)				
154 46/72	47	Ca scirrhosum	+	++
(154 66/72)				
(155 63/72)				
163 06/72	43	Ca sol simplex	++	++
(166 35/72)				
164 41/72	46	Ca scirrhosum	-	-
165 17/72	49	Ca sol simplex	++	++
165 96/72	46	Ca sol simplex	+	-

JN	Alter	Path.-anat.Diagnose	hPL	SP1
166 60/72	45	Ca sol simplex	+	+/-
170 50/72	45	Ca adenosum	++	+
176 33/72	50	Ca scirrhosum	-	-
(177 60/72)				
176 95/72	51	Ca gelatinosum	++	+/-
(182 56/72)				
179 51/72	47	Ca sol simplex	-	-
188 88/72	38	Ca sol simplex	+/-	-
(190 45/72)				
K 70/72	49	Ca sol simplex	+/-	+/-
K 398/72	54	Ca adenosum	++	+
K 1179/72	52	Ca sol simplex	-	+/-
K 2308/72	50	Ca sol medullare	-	-
K 2317/72	48	Ca scirrhosum	+/-	+/-
(K 2317/72)				
(K 2628/72)				
K 2395/72	44	Ca sol simplex	+	+
(K 5589/72)				
K 2429/72	51	Ca sol simplex	+	+/-
K 2552/72	48	Ca gelatinosum	-	-
K 2847/72	40	Ca sol simplex	-	-
(K 2901/72)				
K 3322/72	51	Ca scirrhosum	+/-	-
(K 3363/72)				
K 3342/72	40	Ca sol simplex	+/-	-
K 3546/72	47	Ca sol simplex	++	+
(K 3806/72)				
K 4385/72	46	Ca sol simplex	+	-
K 5287/72	49	Ca adenosum	-	-
K 5419/72	39	Ca adenosum	+	+/-
(K 5462/72)				
K 7316/72	52	Ca adenosum	-	-
K 7847/72	55	Ca scirrhosum	-	-

Tabelle 2: Anfärbung der 92 Gewebeproben in Kontrollen, hPL- und SP1-Färbung (Einteilung nach HORNE)

Gesamt n = 92	(-)	(+/-)	(+)	(++)
Kontrollen	72	19	1	-
hPL-Färbungen	27	19	28	18
SP1-Färbungen	39	32	14	7

Tabelle 3: Anfärbung der 92 Gewebeproben in Kontrollen, hPL- und SP1-Färbung (endgültige Einteilung)

Gesamt n = 92	(-)	(+)
Kontrollen	91	1
hPL-Färbungen	46	46
SP1-Färbungen	71	21

Tabelle 4: Vergleich der Anfärbbarkeit von Mammakarzinomen für hPL und SP1 bei Patientinnen vor und nach der Menopause (n = 39).

Prämenopause (n = 19)				Postmenopause (n = 20)			
hPL		SP1		hPL		SP1	
pos.	neg.	pos.	neg.	pos.	neg.	pos.	neg.
11	8	6	13	11	9	7	13

Tabelle 5: Einteilung der 64 Karzinomschnitte
für hPL und SP1 (nach HORNE)

n = 64	(-)	(+/-)	(+)	(++)
hPL	17	10	24	13
SP1	28	20	11	5

Einteilung der 64 Karzinomschnitte
für hPL und SP1 (endgültige Einteilung)

n = 64	(-)	(+)
hPL	27	37
SP1	48	16

Tabelle 6: Zuordnung der Anfärbbarkeit für hPL
und SP1 zum histologischen Typ

Tumortyp (n = 64)	hPL		SP1	
	pos.	neg.	pos.	neg.
Ca solidum simplex (n = 40)	26	14	12	28
Ca adenosum (n = 9)	6	3	2	7
Ca gelatinosum (n = 3)	2	1	1	2
Ca scirrhum (n = 11)	3	8	1	10
Ca solidum medullare (n = 1)	-	1	-	1

Tabelle 7: Primärtumor-Größe T1 - T4 und
Überlebensrate

Gesamt n = 60	leb.	tot
T1 (n = 14)	12	2
T2 (n = 34)	24	10
T3 (n = 5)	2	3
T4 (n = 7)	3	4

Tabelle 8: Karzinomtyp und Überlebensrate (n = 60)
(für Primärtumor-Größe T1 - T4)

Tumorgröße	Tumortyp	leb.	tot
T1 (n = 14)	Ca solidum simplex	9	-
	Ca adenosum	-	1
	Ca gelatinosum	-	1
	Ca scirrhosum	3	-
	Ca solidum medullare	-	-
T2 (n = 34)	Ca solidum simplex	14	7
	Ca adenosum	4	1
	Ca gelatinosum	2	-
	Ca scirrhosum	3	2
	Ca solidum medullare	1	-
T3 (n = 5)	Ca solidum simplex	1	2
	Ca adenosum	-	-
	Ca gelatinosum	-	-
	Ca scirrhosum	1	1
	Ca solidum medullare	-	-
T4 (n = 7)	Ca solidum simplex	1	3
	Ca adenosum	1	1
	Ca gelatinosum	-	-
	Ca scirrhosum	1	-
	Ca solidum medullare	-	-

Tabelle 9: Zuordnung von Karzinom-Anfärbbarkeit
und Überlebensrate

Gesamt n = 63	hPL		SP1	
	pos.	neg.	pos.	neg.
lebend	24	18	10	32
verstorben	13	8	6	15

Tabelle 10: Zuordnung von Tumortyp, Anfällbarkeit und Überlebensrate

Tumortyp (n = 63)	hPL				SP1			
	positiv		negativ		positiv		negativ	
	leb.	tot	leb.	tot	leb.	tot	leb.	tot
Carcinoma solidum simplex (n = 39)	16	10	10	3	8	4	18	9
Carcinoma adenosum (n = 9)	4	2	1	2	1	1	4	3
Carcinoma gelatinosum (n = 3)	2	-	-	1	1	-	1	1
Carcinoma scirrhosum (n = 11)	2	1	6	2	-	1	8	2
Carcinoma solidum medullare (n = 1)	-	-	1	-	-	-	1	-

Tabelle 11.1.: Tumortyp, Anfärbbbarkeit für hPL
und Überlebensrate (für Primär-
tumor-Größe T1 - T4)

Gesamt n = 60		hPL (+)		hPL (-)	
Tumorgröße	Tumortyp	leb.	tot	leb.	tot
T1 (n = 14)	Ca solidum simplex	4	-	5	-
	Ca adenosum	-	1	-	-
	Ca gelatinosum	-	-	-	1
	Ca scirrhosum	-	-	3	-
	Ca sol medullare	-	-	-	-
T2 (n = 34)	Ca solidum simplex	11	5	3	2
	Ca adenosum	3	-	1	1
	Ca gelatinosum	2	-	-	-
	Ca scirrhosum	2	1	1	1
	Ca sol medullare	-	-	1	-
T3 (n = 5)	Ca solidum simplex	1	2	-	-
	Ca adenosum	-	-	-	-
	Ca gelatinosum	-	-	-	-
	Ca scirrhosum	-	-	1	1
	Ca sol medullare	-	-	-	-
T4 (n = 7)	Ca solidum simplex	-	2	1	1
	Ca adenosum	1	-	-	1
	Ca gelatinosum	-	-	-	-
	Ca scirrhosum	-	-	1	-
	Ca sol medullare	-	-	-	-

Tabelle 11.2.: Tumortyp, Anfärbbbarkeit für SP1
und Überlebensrate (für Primär-
tumor-Größe T1 - T4)

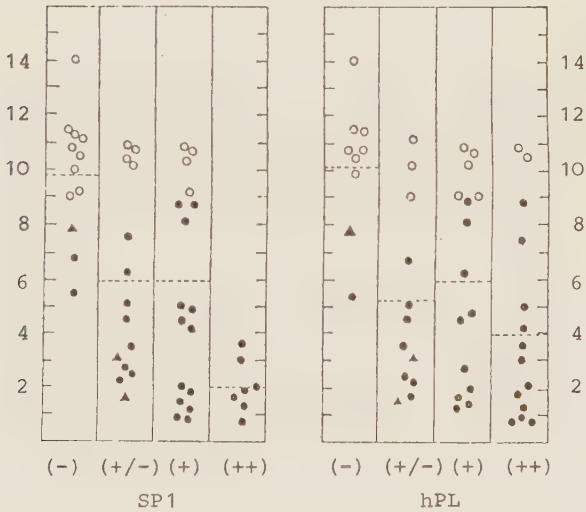
Gesamt n = 60		SP1 (+)		SP1 (-)	
Tumorgröße	Tumortyp	leb.	tot	leb.	tot
T1 (n = 14)	Ca solidum simplex	2	-	7	-
	Ca adenosum	-	1	-	-
	Ca gelatinosum	-	-	-	1
	Ca scirrhosum	-	-	3	-
	Ca sol medullare	-	-	-	-
T2 (n = 34)	Ca solidum simplex	5	2	9	5
	Ca adenosum	1	-	3	1
	Ca gelatinosum	1	-	1	-
	Ca scirrhosum	-	1	3	1
	Ca sol medullare	-	-	1	-
T3 (n = 5)	Ca solidum simplex	1	1	-	1
	Ca adenosum	-	-	-	-
	Ca gelatinosum	-	-	-	-
	Ca scirrhosum	-	-	1	1
	Ca sol medullare	-	-	-	-
T4 (n = 7)	Ca solidum simplex	-	1	1	2
	Ca adenosum	-	-	1	1
	Ca gelatinosum	-	-	-	-
	Ca scirrhosum	-	-	1	-
	Ca sol medullare	-	-	-	-

Tabelle 12: Zuordnung der mittleren Überlebenszeit zur Anfällbarkeit der Karzinome für hPL und SP1 in Abhängigkeit von der Primärtumor-Größe T1 - T4

Gesamt n = 58	hPL						SP1			
	positiv			negativ			positiv		negativ	
	leb.	tot	leb.	tot	leb.	tot	leb.	tot	leb.	tot
T1 (n = 14)	4	0	9	1	2	0	11	1		
mittlere Überlebenszeit (Jahre)	5.1	-	5.2	19	5.0	-	5.2	19		
T2 (n = 33)	18	5	6	4	7	3	17	6		
mittlere Überlebenszeit (Jahre)	5.4	1.9	5.5	3.2	5.3	2.0	5.4	2.7		
T3 (n = 5)	1	2	1	1	1	1	1	2		
mittlere Überlebenszeit (Jahre)	5.7	1.2	5.5	2.0	5.7	0.5	5.5	2.0		
T4 (n = 6)	1	2	2	1	0	1	3	2		
mittlere Überlebenszeit (Jahre)	5.5	2.0	5.7	1.5	-	1.0	5.6	2.3		

Abbildung 7: Ergebnisse der Veröffentlichung von
HORNE und Mitarbeitern (HORNE C.H.W.,
REID I.N. und MILNE G.D., 1976) zum
Vergleich mit den eigenen Ergebnissen:

Übereinstimmung von Anfärbbarkeit der
Schwangerschaftsproteine in Bezug zur
Überlebenszeit



- = Patient am Leben und klinisch unauffällig
- = Patient tot
- ▲ = Patient tot, Tod nicht auf das Mammarkarzinom zurückzuführen

Tabelle 13: Ergebnisse der Veröffentlichung von
HORNE und Mitarbeitern (HORNE C.H.W.,
REID I.N. und MILNE G.D., 1976) zum
Vergleich mit den eigenen Ergebnissen

n = 50	(-)	(+/-)	(+)	(++)
hPL	9	12	15	14
SP1	12	14	17	7

Lebenslauf

Am 19. Mai 1948 wurde ich, Michael G r o h, als zweites von fünf Kindern des Schneidermeisters Berthold G r o h und seiner Ehefrau Edith G r o h, geb. Hamp, in Karlsruhe geboren.

Ich besuchte die Grundschule in Karlsruhe von 1955 bis 1959, anschließend das humanistische Gymnasium in Karlsruhe bis 1962. Danach wechselte ich in die Heimschule Lender in Sasbach b. Achern und bestand dort 1967 das Abitur.

Mein Vater verstarb 1961, meine Mutter 1967.

Nach 1 1/2 Jahren Grundwehrdienst bei der Bundeswehr arbeitete ich ein halbes Jahr in einer Werbeagentur und begann im Winter 1969 mein Studium im Fach Maschinenbau an der Technischen Universität Karlsruhe. Im Sommer 1970 wechselte ich an die Universität Freiburg im Breisgau und studierte dort 5 Semester Rechtswissenschaft.

Anschließend begann ich 1972 in Freiburg mein Medizinstudium, legte 1974 die ärztliche Vorprüfung ab und studierte nach dem ersten klinischen Semester an der Universität München weiter. Dort legte ich im Frühjahr 1976 den ersten und im Frühjahr 1978 den zweiten Teil der ärztlichen Prüfung ab.

Während des Praktischen Jahres arbeitete ich in Starnberg (Anästhesie), Landshut (Innere Medizin) und in der Poliklinik München (Chirurgie).

Im Frühjahr 1979 bestand ich den dritten Teil der ärztlichen Prüfung und erwarb meine Approbation.

Mein Berufsziel ist Arzt für Allgemeinmedizin.

Michael Groh



